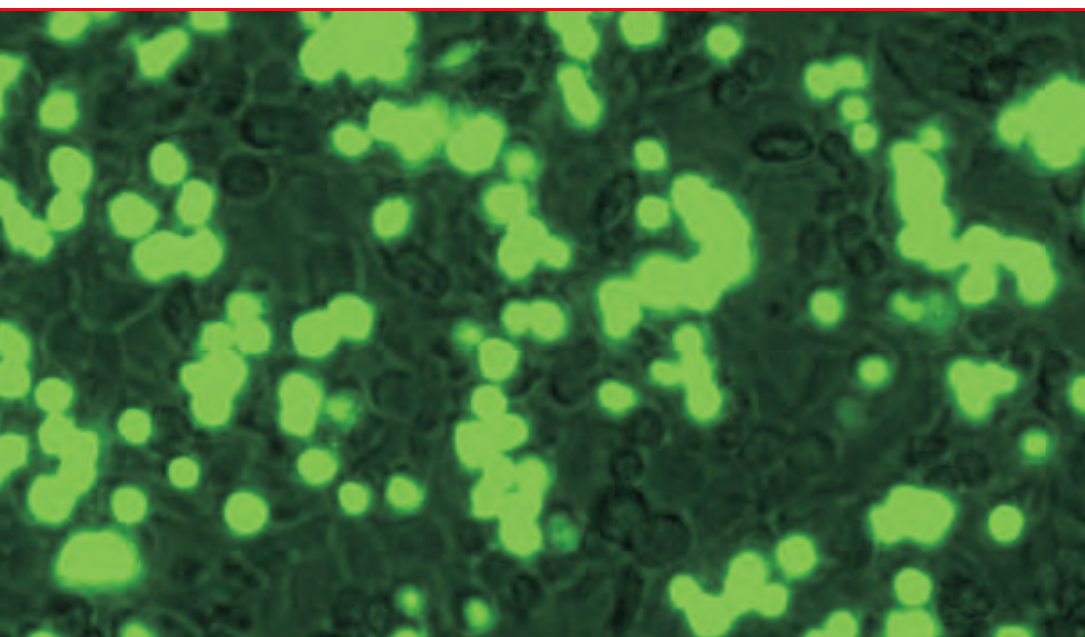


**IDENTIFIZIERUNG DER FÜR DIE BINDUNG AN DEN
ZELLULÄREN, BOVINEN REZEPTOR CD46
VERANTWORTLICHEN SEQUENZBEREICHE INNERHALB
DES GLYKOPROTEINS E2 VON BVDV (NADL)**

JESSICA ROMAN SOSA



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf

**Identifizierung der für die Bindung an den zellulären, bovinen
Rezeptor CD46 verantwortlichen Sequenzbereiche innerhalb des
Glykoproteins E2 von BVDV (NADL)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jessica Roman Sosa
Tierärztin aus Mühlacker

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf
Prof. Dr. Christoph Greveling

Tag der Disputation: 30.04.2009

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Meinen Eltern,
meiner Kloine,
meinem Prinz

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Dr. Tillmann Rümenapf angefertigt. Die Arbeit wurde als Projekt im Sonderforschungsbereich 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ durch die DFG gefördert.

Mein besonderer Dank gilt:

- meinem Betreuer Prof. Dr. Tillmann Rümenapf für das interessante Dissertationsthema, seine Unterstützung und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten.
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Gelegenheit an seinem Institut zu promovieren, für die sehr gute Ausbildung und die Unterstützung bei der beruflichen Fortbildung.
- Dr. Thomas Krey und Manuela Heimann, die mich geduldig und gründlich eingearbeitet haben sowie Benjamin Lamp, Christiane Riedel, Angelika Irmeler und Jessica Schneider für die Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.
- Dr. Matthias König, der mir mit seinem Fachwissen immer wieder weitergeholfen hat und sich mit viel Geduld meinen Computerproblemen widmete.
- Dr. Sybille Herzog für die Bereitstellung des Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Human Antikörpers, der mir die Etablierung des Zell-ELISAs wesentlich erleichterte.
- Babsi, Claudia und Steffie D. sowohl für ihre ständige Hilfsbereitschaft als auch für das Lächeln auf dem Gang und die Besuche in Labor 203, die mir immer eine große Freude waren. Es war schön mit Euch zusammenzuarbeiten.
- Kerstin, die mir immer wieder bei Materialengpässen ausgeholfen hat, so dass ich diese Arbeit zügig vorantreiben konnte.
- Karin und Debo, die sich in guten Zeiten mit mir gefreut und in schlechten Zeiten mein Leid mit mir geteilt haben. Ich bin froh, dass ich das Glück hatte, zwei Menschen wie Euch zu treffen.

- meinen Freunden Chrissi, Sarah, Stefan, Martina, Dani, Petra und Stefan, Iris und David, Elke und Wolfi, die ich besonders in den letzten vier Jahren sehr vernachlässigt habe, aber auf die ich mich trotzdem in jeder Lebenslage verlassen konnte. Danke für Euer immer offenes Ohr und Eure Unterstützung.
- Marcela, Pepe, Vicente, Vinni, Dominique, Noemi, Verena und Yerko, Jorge, mi vecina Veronica und Kinndle, die mich in ihre große lateinamerikanische Familie aufgenommen und mit mir ihre Lebensfreude geteilt haben. Ich danke Euch, für die vielen schönen Stunden.
- Sabrina, die sich ständig Sorgen um meine Gesundheit gemacht hat, für ihre Freundschaft.
- Dr. Jan Schraishuhn für sein Interesse an der Entwicklung dieser Arbeit, die aufbauenden Worte und vielen Ratschläge.
- mi familia cubana por el apoyo y que siempre me han dado
- meinen Eltern, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben konnten. Sie haben den Grundstein für diese Arbeit gelegt, indem sie mir eine gute schulische Ausbildung ermöglicht haben.
- meiner Schwester Jennifer für ihr Verständnis und ihre Rücksicht besonders in den letzten Wochen, meiner Oma, die mir die für diese Arbeit notwendige Disziplin beigebracht hat, meiner Tante, Eni, Ulrike, Beli und Cindy, Uli, Rosi und Clemens, Viktor und Marion, Kevin, Kim und Gundi. Ihr habt mir immer zugehört und mich auf Eure Weise ermutigt weiter zu machen. Ich bin dankbar und glücklich so eine Familie zu haben.
- meinem Kollegen Gleyder, der mir die proteinbiochemischen Methoden, die für die Entwicklung des ELISAs notwendig waren beigebracht hat und der nie müde wurde meine Fragen zu beantworten oder mit mir über meine Ergebnisse zu diskutieren. Zu Hause warst Du mir ein noch besserer Ehemann, der mit viel Liebe gegen meinen Frust kämpfte, wenn mal wieder nichts geklappt hat und der mir den nötigen Rückhalt gab, um mein Ziel zu erreichen. Du bist das Wertvollste, das ich nach diesen vier Jahren mit mir nehme.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie (Fachbereich 10), die ich während meiner Tätigkeit dort kennengelernt habe, da sie alle direkt- oder indirekterweise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 17 -
1.1	<i>BVDV</i>	- 17 -
1.2	<i>Invasion von Viren</i>	- 20 -
1.3	<i>Interaktion zwischen zellulären Rezeptoren und viralen Liganden von Pestiviren</i>	- 21 -
1.3.1	Zelluläre Rezeptoren für Pestiviren.....	- 21 -
1.3.1.1	Eigenschaften und Funktion des Rezeptors CD46.....	- 24 -
1.3.2	Pestivirale Proteine, die mit zellulären Rezeptoren interagieren	- 27 -
1.3.2.1	Eigenschaften und weitere Funktionen der Strukturproteine E ^{rns} und E2	- 27 -
1.3.2.1.1	Molekulare Charakterisierung der CD46 _{bov} -Bindungsdomäne im BVDV E2	- 31 -
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	- 33 -
2	Material und Methoden	- 34 -
2.1	<i>Material</i>	- 34 -
2.1.1	Eukaryotische Zelllinien	- 34 -
2.1.2	Prokaryotische Zelllinien	- 34 -
2.1.3	Virusstämme	- 34 -
2.1.4	Antikörper	- 34 -
2.1.5	Enzyme.....	- 35 -
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien.....	- 35 -
2.1.7	Kits	- 37 -
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	- 38 -
2.1.9	Geräte.....	- 38 -
2.2	<i>Methoden</i>	- 40 -
2.2.1	Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten.....	- 40 -
2.2.1.1	Medien und Puffer	- 40 -
2.2.1.2	Allgemeine Zellkulturarbeiten.....	- 41 -
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	- 41 -
2.2.1.4	Transfektion von zirkulärer Plasmid-DNS	- 42 -
2.2.1.5	Elektroporation von RNS in MDBK-Zellen	- 43 -
2.2.1.6	Titration zur Bestimmung des Virustiters.....	- 43 -
2.2.1.7	Indirekter immunhistochemischer Nachweis.....	- 44 -
2.2.1.7.1	Indirekter Immunperoxidase Assay	- 44 -
2.2.1.7.2	Zell-ELISA zur Bestimmung der E2-Expression.....	- 45 -
2.2.1.8	Zelladsorptionstest.....	- 46 -
2.2.1.9	Zytoplasmatische Markierung von Zellen	- 47 -
2.2.1.9.1	Plaueassay zur Bestimmung des hemmenden Effekts von CD46 _{bov} -Fc _{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen	- 47 -

2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	- 48 -
2.2.2.1	Anzucht von Bakterien	- 48 -
2.2.2.2	Plasmidisolierung	- 49 -
2.2.2.3	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	- 50 -
2.2.2.4	Phenol/ Chloroform Extraktion von DNS.....	- 51 -
2.2.2.5	Ethanolpräzipitation von DNS/ RNS und Isopropanolpräzipitation von DNS	- 52 -
2.2.2.6	Quantifizierung von DNS	- 52 -
2.2.2.7	DNS- bzw. RNS-Agarose Gelelektrophorese	- 53 -
2.2.2.8	Aufreinigung von DNS-Fragmenten.....	- 54 -
2.2.2.9	Ligation von DNS-Fragmenten	- 54 -
2.2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 55 -
2.2.2.11	Klonierung von PCR-Produkten	- 56 -
2.2.2.12	Ortsgerichtete Mutagenese („ <i>Site-Directed Mutagenesis</i> “)	- 57 -
2.2.2.13	<i>In vitro</i> Transkription.....	- 58 -
2.2.2.14	Sequenzierung von DNS mittels „ <i>Cycle Sequencing</i> “ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer	- 59 -
2.2.2.15	Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	- 60 -
2.2.3	Klonierungen.....	- 61 -
2.2.3.1	Synthetische Oligonukleotide	- 61 -
2.2.3.2	Klonierung der NADL/ Alfort E2-Chimären.....	- 65 -
2.2.3.2.1	Klonierung der E2-Chimären zur Charakterisierung des Einflusses der variablen Sequenzabschnitte im NADL E2 auf die CD46 _{bov} -Bindung.....	- 65 -
2.2.3.2.2	Klonierung der E2-Chimären zur Charakterisierung der Aminosäureabschnitte Y ₅₅ LQRCTRET ₆₃ , H ₁₇₉ NcI ₁₈₂ , E ₂₄₅ gVAiVPQgTLK ₂₅₆ und Q ₂₆₅ vIaMdTK ₂₇₂	- 66 -
2.2.3.3	Klonierung der Alfort/ NADL E2-Chimären.....	- 68 -
2.2.3.4	Etablierung eines Fusionsplasmids aus bovinem CD46 (CD46 _{bov}) und humanem Fc-Fragment (Fc _{hum}).....	- 69 -
2.2.3.5	Klonierung eines pTre Plasmids mit bovinem CD46 und humanem Fc-Fragment zur Herstellung von Tet on Zelllinien.....	- 70 -
2.2.3.6	Kolokalisierung von CD46 _{bov} -Fc _{hum} mit NADL und Alfort E2	- 71 -
2.2.3.6.1	Einbettungsmedium (Mowiol)	- 72 -
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	- 72 -
2.2.4.1	Zelllyse	- 72 -
2.2.4.2	SDS-PAGE mit Tris-Tricin-Puffer	- 73 -
2.2.4.3	Immunoblot Analyse von Proteinen (Western Blot).....	- 74 -
2.2.4.4	Proteinfärbung:	- 75 -
2.2.4.4.1	Coomassie-Färbung	- 75 -
2.2.4.4.2	Silberfärbung von Proteinen	- 75 -

2.2.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration („BC-Mikroassay“)	- 76 -
2.2.4.6	Nachweis von löslichen Proteinen (NADL E2, CD46 _{bov} -Fc _{hum}) im ELISA	- 77 -
2.2.5	Generierung und Reinigung des Fusionsproteins aus löslichem, bovinem CD46 und humanem Fc-Fragment	- 78 -
2.2.5.1	Etablierung induzierbarer, CD46 _{bov} -Fc _{hum} -exprimierender BHK Tet on Zelllinien	- 78 -
2.2.5.2	Gewinnung von CD46 _{bov} -Fc _{hum} -haltigen Überständen	- 79 -
2.2.5.3	Reinigung des Fusionsproteins CD46 _{bov} -Fc _{hum}	- 79 -
2.2.6	Etablierung eines Zell-ELISAs zur Quantifizierung der E2-CD46 _{bov} -Bindung	- 81 -
2.2.7	Bestimmung der E2-CD46 _{bov} -Bindung unter Verwendung von löslichem NADL E2	- 82 -
2.2.7.1	Untersuchung des Einflusses von anti-CD46-mAks auf die E2-CD46 _{bov} -Bindung	- 83 -
3	Ergebnisse	- 85 -
3.1	<i>Identifikation und Charakterisierung der für die Interaktion mit CD46_{bov} essentiellen Aminosäuren im NADL E2</i>	- 85 -
3.1.1	Herstellung von NADL/ Alfort Glykoprotein E2-Chimären durch Austausch variabler Sequenzbereiche im NADL E2	- 87 -
3.1.2	Western Blot Analyse und immunhistochemischer Nachweis der Expression der chimären E2 Proteine	- 90 -
3.1.3	Untersuchung des Einflusses ausgetauschter Sequenzabschnitte auf die CD46 _{bov} -Bindung im Zelladsorptionstest	- 92 -
3.1.4	Identifizierung der für die CD46 _{bov} -Bindung essentiellen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y ₅₅ LQRCTRET ₆₃ , H ₁₇₉ NcI ₁₈₂ , E ₂₄₅ gvAiVPQgTLK ₂₅₆ und Q ₂₆₅ vIaMdTK ₂₇₂ des NADL E2	- 97 -
3.1.4.1	Charakterisierung der Aminosäuren der Peptidsequenz Y ₅₅ LQRCTRET ₆₃	- 98 -
3.1.4.2	Untersuchung der Relevanz der Aminosäuren der Peptidsequenz H ₁₇₉ NcI ₁₈₂	- 101 -
3.1.4.3	Bedeutung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz E ₂₄₅ gvAiVPQgTLK ₂₅₆	- 102 -
3.1.4.4	Analyse der für die CD46 _{bov} -Bindung verantwortlichen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz Q ₂₆₅ vIaMdTK ₂₇₂	- 107 -
3.1.5	Untersuchung der CD46 _{bov} -Bindung von Alfort/ NADL E2-Chimären	- 109 -
3.2	<i>Etablierung eines quantitativen E2-CD46_{bov}-Bindungstests</i>	- 111 -
3.2.1	Bindungsassay im ELISA-Format mit gereinigtem CD46 _{bov}	- 112 -
3.2.1.1	Generierung und Reinigung des Fusionsproteins CD46 _{bov} -Fc _{hum}	- 114 -
3.2.1.1.1	Klonierung	- 114 -
3.2.1.1.2	Expression	- 115 -
3.2.1.1.3	Affinitätsreinigung von CD46 _{bov} -Fc _{hum}	- 116 -
3.2.1.2	Untersuchung der Funktionalität des löslichen Fusionsproteins CD46 _{bov} -Fc _{hum}	- 117 -

3.2.1.2.1	Kolokalisierung des CD46 _{bov} -Fc _{hum} und des NADL (BVDV) E2 bzw. Alfort (KSPV) E2 mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	118 -
3.2.1.2.2	Anwendung des CD46 _{bov} -Fc _{hum} im ELISA auf NADL bzw. Alfort E2-exprimierenden Zellen	119 -
3.2.1.2.3	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Fusionsproteins im ELISA unter Verwendung von löslichem NADL E2	122 -
3.2.1.2.4	Analyse des Einflusses von CD46 _{bov} -Fc _{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen mit KSPV-Stamm Alfort und BVDV-Stamm NADL	124 -
3.3	<i>Bestimmung der Bindungsaktivität zwischen CD46_{bov} und den NADL/ Alfort E2- Chimären im Zell-ELISA</i>	125 -
4	Diskussion	133 -
4.1	<i>Charakterisierung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne im Glykoprotein E2 von NADL</i>	133 -
4.2	<i>Bedeutung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅GgvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ für die CD46_{bov}-Bindung</i>	139 -
5	Zusammenfassung	146 -
6	Summary	148 -
7	Literaturverzeichnis	150 -

Abkürzungen

A	Adenosin
aa	„ <i>amino acid</i> “, Aminosäure
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarbazol
AM	Ausgangsmaterial
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Asn (A)	Asparagin
ATCC	„ <i>American Type Culture Collection</i> “
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	„ <i>BorderDisease Virus</i> “
BHK	„ <i>Baby Hamster Kidney</i> “
bov	bovin
BSA	Bovines Serumalbumin
BVDV	„ <i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> “, Virus der bovinen Virusdiarrhö
°C	Celsius
C	Cystein
ca.	zirka
CCP	„ <i>Complement Control Protein</i> “
cm	Zentimeter
CRIB	„ <i>Cells Resistant to Infection with BVDV</i> “
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cut off	Schwellenwert
D	Asparaginsäure
DABCO	1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octan
defiz.	defizient
DL	Durchlauf
DMEM	Dulbecco's „ <i>Minimal Essential Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	eluierte Fraktion
E	Glutaminsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> “
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E ^{rns}	„ <i>Envelope</i> “, Hülle; „ <i>ribonuclease secreted</i> “
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
G	Glyzin
GAG	Glukosaminoglykane
H	Histidin
h	„ <i>hour</i> “, Stunde
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis C Virus
hCMV	humanes Zytomegalie-Virus
HPRI	„ <i>Human Placenta Ribonuclease Inhibitor</i> “
hum	human
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IRES	„ <i>Internal Ribosomal Entry Site</i> “, interne Ribosomenbindungsstelle
IU	„ <i>International Units</i> “, internationale Einheiten
Jiv	„ <i>J-domain-protein interacting with viral protein</i> “
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertani
LDL-R	„ <i>Low Density Lipoprotein Receptors</i> “
	Mikro
m	Milli
M	Methionin
M	Molar

mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	„ <i>Membrane Cofactor Protein</i> “, CD46
MD	„ <i>Mucosal Disease</i> “
MDBK	„ <i>Marbin Darby Bovine Kidney</i> “
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNS	„ <i>messenger RNS</i> “
n	nano
N ^{pro}	N-terminal protease
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
NTR	nicht translatierte Region
N-Terminus	Aminotermminus
nzp	nicht zytopathogen
OD	optische Dichte bei „x“ _{nm}
ORF	„ <i>Open Reading Frame</i> “, offener Leserahmen
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„ <i>Phosphate Buffered Saline</i> “, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PK	„ <i>Porcine Kidney</i> “
PO	Peroxidase
Q	Glutamin
r	rekombinant
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RCA	„ <i>Regulators of Complement Activation</i> “, Regulatoren der Komplementaktivierung
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rNTP	„ <i>ribosomal Nucleotide Tri-Phosphate</i> “
rpm	„ <i>rotation per minute</i> “, Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtTA	„ <i>reverse tetracycline-controlled Transactivator</i> “
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser (S)	Serin

SK	„ <i>Swine Kidney</i> “
SR-BI	„ <i>Scavenger Receptor class B member I</i> “
ss	Einzelstrang
STP-Region	Serin-Threonin-Prolin-reiche Region
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	„ <i>Tris Buffered Saline</i> “
TCID ₅₀	„ <i>Tissue Culture Infectious Dosis 50</i> “
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr (T)	Threonin
TMB	Tetramethylbenzidine
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNS	„ <i>transfer</i> “ RNS
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
zp	zytopathogen

1 Einleitung

1.1 BVDV

Das Genus *Pestivirus* gehört zusammen mit den Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* der Virusfamilie *Flaviviridae* an. Dabei weist es die meisten Ähnlichkeiten mit dem Genus *Hepacivirus* und dessen sehr bedeutendem Vertreter Hepatitis C Virus (HCV) auf. Den Pestiviren gehören gegenwärtig die folgenden Spezies an: Virus der bovinen Virusdiarrhö Typ 1 und Typ 2 (BVDV-1 bzw. -2), Virus der klassischen Schweinepest (KSPV), „Border Disease“ Virus (BDV) sowie ein Isolat der Giraffe (Giraffe-1; (Becher et al., 2003; Fauquet et al., 2005; Rümenapf und Thiel 2008) Bislang nicht klassifizierte Pestiviren sind die Isolate „Hobi“ und „Antilope“ sowie die „Tunesischen Isolate“ (Rümenapf und Thiel 2008).

Pestiviren sind RNS-Viren mit einer Größe von etwa 40-60nm (Horzinek et al., 1971; Enzmann und Weiland 1978; Lindenbach et al., 2007). Die virale Nukleinsäure befindet sich in einem vermutlich ikosaedrischen Nukleokapsid, das von einer Doppellipidmembran (Horzinek et al., 1967; Rümenapf et al., 1991a) und den darin verankerten viralen Glykoproteinen umgeben ist. Aufgrund der Lipidhülle sind Pestiviren äußerst empfindlich gegenüber Substanzen wie Chloroform, Äther und Detergentien. Im Gegensatz zu den anderen Genera dieser Familie weisen sie jedoch eine erhebliche Resistenz gegenüber Ansäuerungen ihres Milieus auf (Depner et al., 1992; Krey et al., 2005).

Das pestivirale Genom stellt eine einzelsträngige RNS mit einer Länge von mindestens 12,3kb dar. Ausnahmen bilden einige BVDV-Isolate, die infolge von Duplikationen oder Insertionen zellulärer Sequenzen eine Genomgröße von bis zu 16,5kb aufweisen (Meyers und Thiel 1996). Wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae* liegt die RNS in positiver Orientierung vor („messenger sense“) und verfügt über einen einzigen offenen Leserahmen (ORF). Das 5′- und 3′- Ende wird von einer nicht translatierten Region (NTR) flankiert. Dabei kommt der 5′-NTR aufgrund ihrer komplexen Sekundärstruktur die Funktion einer internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) zu, die die Initiation der Translation vermittelt (Poole et al., 1995; Rijnbrandt et al., 1997). Auch für Hepatitis C wurde ein solches IRES-Element

beschrieben (Tsukiyama-Kohara et al., 1992), was einen fundamentalen Unterschied zu Vertretern des Genus *Flavivirus* darstellt, deren Translationsinitiation durch eine „Cap“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Poole et al., 1995). Die pestivirale 3'-NTR besteht aus 188 bis 276 Nukleotiden und ist nicht polyadenyliert (Collett et al., 1988a; Becher et al., 1998).

Der offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren, welches ko- und posttranslational von viralen und zellulären Proteasen in 12 reife Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten wird (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1988b; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Am N-Terminus des Polyproteins befindet sich das Nichtstrukturprotein N^{pro}, eine Autoprotease, die ihren eigenen Carboxyterminus abspaltet (Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Die folgenden vier Strukturproteine: das Kapsidprotein (C) und die Glykoproteine E^{ms} („*ribonuclease secreted*“), E1 und E2 sowie das hydrophobe Nichtstrukturprotein p7 werden durch das zelluläre Enzym Signalase freigesetzt (Rümenapf et al., 1993; Lin et al., 1994; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Die letzten beiden Drittel des offenen Leserahmens kodieren für die Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A und 4B, NS5A und 5B, welche die strukturellen und enzymatischen Komponenten des viralen Replikationskomplexes darstellen. Deren Spaltung erfolgt mittels der viralen Serinprotease NS3 und deren Kofaktor NS4A (Wiskerchen et al., 1991; Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997). Eine Ausnahme liegt bei der Prozessierung von NS2-3 vor, da die Autoprotease NS2 die Spaltung von NS3 katalysiert (Lackner et al., 2004). Die Effizienz der Spaltung wird dabei von einem zellulären Chaperon, Jiv („*J-domain-protein interacting with viral protein*“), reguliert (Lackner et al., 2005).

BVDV-Stämme der Spezies BVDV-1 und BVDV-2 verursachen bei immunkompetenten Rindern im Allgemeinen einen subklinischen Verlauf oder ein mit einer milden Diarrhö, respiratorischen Symptomen oder Fertilitätsstörungen einhergehendes Krankheitsgeschehen (Potgieter et al., 1985; Baker 1987; Thiel et al., 1996). Dabei entstehen durch Letzteres die größten wirtschaftlichen Verluste. Allerdings befinden sich in der Spezies BVDV-2 auch einige hochvirulente Stämme, die durch hohes Fieber und Hämorrhagien gekennzeichnete Krankheitsausbrüche verursachen (Pellerin et al., 1994; Ridpath und Bolin 1995).

Entsprechend ihrem Verhalten in Zellkultur lassen sich die BVDV-Stämme in zytopathogene (zp) und nicht zytopathogene (nzp) Biotypen unterteilen. Während nzp Stämme weder makro- noch mikroskopische Veränderungen in permissiven Zellen hervorrufen, führt die Infektion mit dem zp Biotyp zur Vakuolisierung des Zytoplasmas, Kernpyknose, Abkuglung und Apoptose der Zellen (Gillespie et al., 1960; Liess 1967; Grummer et al., 1998). Die diaplazentäre Infektion eines Fetus mit einem nzp Virus im ersten Drittel der Trächtigkeit führt zur Geburt persistent infizierter, immuntoleranter Kälber. Diese scheiden größere Mengen an Virus aus, was bei der Ausbreitung des Erregers eine zentrale Rolle spielt. Die persistierende Infektion mit einem nzp Stamm ist auch die Voraussetzung für die Entstehung der so genannten „*Mucosal Disease*“ (Liess et al., 1974). Diese ist stets letal verlaufend und unter anderem gekennzeichnet durch unstillbare, meist blutige Durchfälle. Aus Tieren, die an „*Mucosal Disease*“ erkrankt sind, können stets zp und nzp Viren mit enger antigenetischer Verwandtschaft isoliert werden. (McClurkin et al., 1985; Corapi et al., 1988; Meyers et al., 1996; Meyers und Thiel 1996). Nach der Superinfektion persistent infizierter Tiere mit einem antigenetisch verwandten zp Virus kommt es zur Rekombination mit dem nzp Virus, wobei die genetischen Informationen für den zytopathogenen Phänotyp auf das nzp Virus übertragen werden (Fritzemeier et al., 1997). Die resultierenden zp Viren können sich schließlich aufgrund der Immuntoleranz des Wirtstieres ungehindert ausbreiten.

In vielen Ländern mit intensiver Schweinehaltung ist die klassische Schweinepest von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Edwards et al., 2000; Saatkamp et al., 2000). Infektionen mit der klassischen Schweinepest zeigen ein sehr variables klinisches Bild. Neben akuten Krankheitsverläufen mit hoher Letalität kommen auch chronische und subklinische Krankheitsverläufe mit niedriger Letalität vor. Dabei variieren die Sterblichkeit und die Ausprägung der Symptome je nach Virulenz des entsprechenden Virusstammes (Thiel et al., 1996). Jedoch ist das Krankheitsbild als Folge staatlicher Bekämpfungsmaßnahmen meist unspezifisch und es werden chronische Formen der Erkrankung mit unspezifischem Verlauf beobachtet (Dunne 1973; Thiel et al., 1996; Lindenbach und Rice 2001; Lindenbach et al., 2007).

Die „*Border Disease*“ der Schafe und Ziegen verläuft nach einer akuten, horizontalen Infektion meist subklinisch oder es treten nur milde Symptome, wie z.B. Diarrhö und Fertilitätsstörungen auf (Shaw et al., 1967; Vantsis et al., 1979). Intrauterine Infektionen

haben jedoch den Abort des Fetus, Missbildungen („*hairy shaker disease*“: zentralnervöse Störungen, Veränderungen des Haarkleides, Tremor und Ataxie) oder die Geburt lebensschwacher, persistent infizierter Lämmer zur Folge (Meyers und Thiel 1996; Thiel et al., 1996).

Die Bezeichnung der Virusspezies geht jeweils auf die Tierart zurück, aus der sie ursprünglich isoliert wurde und in der die betreffende Krankheit auftrat. Pestivirusinfektionen betreffen ausschließlich Paarhufer, wovon sowohl domestizierte als auch wildlebende Schweine und Wiederkäuer, wie z.B. Gnus, Rothirsche, Rehe und Giraffen betroffen sein können (Pritchard 1963; Moennig et al., 1990). Auch in Zellkultur sind mit wenigen Ausnahmen ausschließlich Zelllinien aus Paarhufern empfänglich für Pestiviren. Eine unter natürlichen Bedingungen auftretende KSPV-Infektion konnte bisher nur bei Schweinen nachgewiesen werden. Weniger eingeschränkt ist das Wirtsspektrum der beiden ruminanten Pestiviren BVDV und BDV, die unter natürlichen Bedingungen Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine und Wildwiederkäuer infizieren können (Hamblin und Hedger 1979; Paton et al., 1992; Vilcek und Belak 1996; Becher et al., 1999; Walz et al., 2004; Wieringa-Jelsma et al., 2006). Interessanterweise löst BVDV in Schafen und Ziegen die gleichen Krankheitssymptome wie BDV aus. Allerdings gibt es keine bestätigten Hinweise auf BDV induzierte Erkrankungen beim Rind (Rümenapf und Thiel 2008).

1.2 Invasion von Viren

Viren verfügen über keinen eigenen Stoffwechsel und sind daher bei der Replikation ihres Genoms und der Synthese ihrer Proteine auf den Stoffwechsel einer lebenden Zelle angewiesen. Für eine erfolgreiche Infektion ist es deshalb entscheidend, dass das virale Genom an den Ort der Replikation (Zytoplasma, Nukleus) gebracht wird. Bei nahezu allen Viren lässt sich die Infektion in folgende sechs Stadien einteilen: Adsorption, Penetration, Freisetzung des viralen Genoms („*uncoating*“), Replikation und Biosynthese der viralen Proteine, Morphogenese („*assembly*“) und Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel (Pe'ery und Mathews 2007). Adsorption und Penetration werden als frühe Ereignisse einer Virusinfektion bezeichnet und stellen zusammen mit der Freisetzung des viralen Genoms den Invasionsprozess im engeren Sinne dar.

Während der Adsorption findet eine spezifische Interaktion zwischen molekularen Untereinheiten des Viruspartikels und Strukturen der Zelloberfläche statt, was zur Bindung des Virions an die Wirtszelle führt. Das zelluläre Oberflächenmolekül, an welches ein bestimmtes Virus bindet, wird als Virusrezeptor bezeichnet (Marsh und Helenius 1989; White und Littman 1989). Neben der Adsorption initiiert der Virusrezeptor auch die Penetration, das Durchdringen des Virus durch die Zytoplasmamembran (Tardieu et al., 1982). Dabei werden im Wesentlichen zwei Mechanismen unterschieden: die Oberflächenfusion und die rezeptorvermittelte Endozytose. Während unbehüllte Viren die Zellen nur mittels rezeptorvermittelter Endozytose passieren können, wurden für behüllte Viren beide Penetrationsmechanismen beschrieben (Marsh und Helenius 1989; Kielian und Jungerwirth 1990). Über die anschließende Freisetzung der viralen Nukleinsäure aus dem Nukleokapsid („*uncoating*“) ist bislang nur wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass das Nukleokapsid („*core*“) von Alphaviren beim „*uncoating*“ zunächst an die 60S Ribosomenuntereinheit der Wirtszelle bindet (Wengler et al., 1996). Anschließend kommt es zur Übertragung von Core Protein auf die Ribosomen, begleitet von einem Abbau des Nukleokapsids. Die Bindung an die Ribosomen wird vermutlich durch eine an der Oberfläche des Nukleokapsids gelegene Ribosomenbindungsstelle (RBS) vermittelt (Wengler et al., 1996).

1.3 Interaktion zwischen zellulären Rezeptoren und viralen Liganden von Pestiviren

1.3.1 Zelluläre Rezeptoren für Pestiviren

In der Literatur vorhandene Daten weisen auf verschiedene zelluläre Moleküle hin, die als Rezeptoren bei der Invasion von Pestiviren in Frage kommen.

Xue et al. (1991) identifizierte auf MDBK-Zellen ein Zelloberflächenprotein von 50kDa, wofür er eine Rezeptoreigenschaft für BVDV postulierte. Seine Untersuchungen führte er mittels anti-idiotypischer Antikörper (anti-ids) durch, die gegen einen anti-E2-Antikörper gerichtet waren. Dabei wurde vorausgesetzt, dass es sich bei dem rezeptorbindenden Liganden um das virale Strukturprotein E2 handelt (Xue und Minocha 1993). Mit dem Nachweis des 50kDa Proteins in BVDV-unempfindlichen Zellen (Xue und Minocha 1996), wurde dessen Bedeutung als Rezeptormolekül jedoch unwahrscheinlich.

Aufgrund von Untersuchungen über die Beteiligung des „*Low Density Lipoprotein Receptors*“ (LDL-R) bei der rezeptorvermittelten Endozytose verschiedener Flaviviren, wurde angenommen, dass der LDL-Rezeptor an der Infektion mit BVDV beteiligt ist (Agnello et al., 1999). Diese Vermutung widerlegen allerdings aktuellere Studien, in denen gezeigt wurde, dass gegen den LDL Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper (mAks) keine infektionshemmende Wirkung auf BVDV besitzen (Krey et al., 2006b). Außerdem war es möglich, funktionstüchtige LDL-R Moleküle auf der Oberfläche von so genannten „*Cells Resistant to BVDV Infection*“ (CRIB-Zellen: bovine Zellen mit spezifischer Resistenz gegenüber allen Pestiviren zu detektieren (Flores und Donis 1995).

Auch Interaktionen von Pestiviren mit geladenen Zelloberflächenstrukturen wurden beschrieben, woran das Virushüllprotein E^{rns} wesentlich beteiligt ist. Zum Beispiel war es möglich, die Infektion von Kulturzellen mit dem Virus der klassischen Schweinepest durch die Zugabe von Heparin und Dextransulfat bzw. durch vorherige Heparinase-Behandlung zu hemmen (Hulst und Moormann 2001). Dies traf aber nicht auf Viren zu, die direkt aus infizierten Tieren isoliert wurden, es sei denn, sie wurden anschließend auf Kulturzellen amplifiziert. Sequenzanalysen zeigten, dass der veränderte Phänotyp auf den Austausch einer einzigen Aminosäure im E^{rns} zurückgeführt werden kann (Hulst et al., 2001). Auch für BVDV-Stamm PE515 konnte *in vitro* die Interaktion des Virushüllproteins E^{rns} mit verschiedenen Glukosaminoglykanen (Heparin, Dermatansulfat) beobachtet werden (Iqbal et al., 2000). Des Weiteren ließ sich auch die Virusinfektion durch Präinkubation mit diesen Substanzen hemmen (Iqbal et al., 2000).

Die Isolierung der drei monoklonalen Antikörper (BVD/ Ca 17, 26 und 27), die gegen die Oberfläche von bovinen Zellen gerichtet waren (Schelp et al., 1995), ermöglichte die Identifizierung von CD46 als zellulären Rezeptor für BVDV. Die Antikörper wurden interessanterweise im Verlauf einer Immunisierung von Mäusen mit angereicherten BVDV Virionen erhalten und bei der Charakterisierung von BVDV-neutralisierenden Antikörpern identifiziert (Schelp et al., 1995). Sie waren in der Lage, verschiedene BVDV-Stämme spezifisch und konzentrationsabhängig an der Infektion boviner Zellen zu hindern, wobei einige Virusstämme sogar vollständig gehemmt werden konnten. Die von den drei monoklonalen Antikörpern (mAks) gleichermaßen erkannten Proteine hatten ein apparentes Molekulargewicht von ca. 60 und 90kDa und konnten nur auf bovinen Zellen nachgewiesen

werden (Schelp et al., 1995). Aufbauend auf dieser Arbeit gelang die Darstellung des 60kDa Proteins aus Kalbsthymus mittels Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des mAk BVD/ Ca 17 (Maurer et al., 2004). Die Identifizierung des gereinigten Proteins als bovines CD46 (CD46_{bov}), erfolgte mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung. Nach Expression des Proteins in heterologen Zellen konnte eine spezifische Virusbindung beobachtet werden, womit CD46_{bov} als zellulärer Rezeptor für BVDV identifiziert wurde. Infolge der Expression des bovinen CD46 in der porzinen Zelllinie PK15 konnte sogar deren geringgradige Empfänglichkeit für BVDV um den Faktor 100 gesteigert werden. (Maurer et al., 2004).

Für eine erfolgreiche Invasion des verwandten Hepatitis C Virus werden unter anderem das Tetraspanin CD81, der „*Scavenger Receptor class B member I*“ (SR-BI), Claudin-1 und vermutlich Glukosaminoglykane benötigt (Barth et al., 2006; Bartosch und Cosset 2006; Cocquerel et al., 2006; Evans et al., 2007). Aktuelle Daten belegen, dass bei der Adsorption von BVDV ebenfalls mehrere Rezeptoren beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass die Empfänglichkeit BVDV-resistenter Zellen nicht bovinen Ursprungs durch die Expression von CD46_{bov} unbeeinflusst bleibt (Maurer et al., 2004). Für CRIB-Zellen, deren Phänotyp auf eine Mutation eines zentralen Faktors des Invasionsprozesses zurückzuführen ist, war es mittels molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen möglich, die Funktionalität des CD46_{bov} Moleküls als Ursache für die Resistenz auszuschließen (Flores und Donis 1995; Krey 2004). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Präinkubationen von Zellen mit anti-CD46-Antikörpern eine Infektionshemmung zur Folge haben, die je nach BVDV-Stamm und Isolat unterschiedlich effizient ist (Krey et al., 2006a). Ein weiteres wesentliches Indiz lieferten die Studien zur Charakterisierung des Penetrationsmechanismus von BVDV. Da die Penetration von BVDV mit hoher Wahrscheinlichkeit über rezeptorvermittelte, Clathrin-abhängige Endozytose erfolgt (Krey et al., 2005), wird der virale Ligand zusammen mit dem die Endozytose induzierenden Rezeptor internalisiert. In vorläufigen Untersuchungen konnte jedoch keine gemeinsame Internalisierung von CD46_{bov} und seinem Liganden nachgewiesen werden (persönliche Auskunft von T. Krey).

Die Identifikation weiterer an der Zell-Virus-Interaktion beteiligter zellulärer Faktoren war bislang noch nicht möglich.

1.3.1.1 Eigenschaften und Funktion des Rezeptors CD46

Das auch als „*Membrane Cofactor Protein*“ (MCP) bezeichnete Glykoprotein CD46 kommt in allen kernhaltigen Zellen vor. Es gehört zur Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) und schützt die körpereigenen Gewebe vor der unspezifischen Selbstzerstörung, indem es die aktivierten Komplementkomponenten C3b und C4b bindet (Liszewski und Atkinson 1992). Der N-terminale, extrazelluläre Teil des CD46 enthält vier für RCA-Proteine typische Module, die so genannten „*Complement Control Proteins*“ (CCP). Hierbei handelt es sich um Domänen bestehend aus etwa 60-70 Aminosäuren (Chung und Reid 1985). Sie enthalten jeweils vier hoch konservierte Cysteine und ein konserviertes Tryptophan (Hourcade et al., 1989). C-terminal der CCPs schließt sich eine Region mit überdurchschnittlich vielen Serinen, Threoninen und Prolinen (STP-Region) an, der eine zwölf Aminosäuren lange Sequenz unbekannter Funktion folgt. CD46 ist ein Typ 1 Transmembranprotein, das über eine hydrophobe Transmembranregion in der Plasmamembran verankert wird. Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich die kurze C-terminale Domäne (Cyt). Dabei wird zwischen Cyt1 und 2 unterschieden (Abb. 1a).

Infolge alternativen Spleißens entstehen verschieden große Isoformen des Proteins, die sich aufgrund der variablen Transkription verschiedener Exons in der STP-Region und dem Vorkommen einer der beiden zytoplasmatischen Domänen unterscheiden (Post et al., 1991; Purcell et al., 1991; Riley et al., 2002). In den meisten Zelltypen werden die Spleißvarianten gleichzeitig exprimiert, wodurch ein heterogenes Erscheinungsbild nach elektrophoretischer Auftrennung entsteht. Sowohl der größeren Bande (59-68kDa) als auch der kleineren (50-58kDa) können drei Isoformen zugeordnet werden (Post et al., 1991). Der apparente Größenunterschied beider Banden lässt sich durch extensive O-Glykosylierung in der STP-Region erklären (Liszewski und Atkinson 1992).

Eine Vielzahl von Krankheitserregern nutzt das humane CD46 als Rezeptor, so z.B. zellkulturadaptierte Stämme und zwei Laborstämme (Edmonston und Hallé) des Masernvirus (Dorig et al., 1993; Naniche et al., 1993), das humane Herpesvirus 6 (Santoro et al., 1999), das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* (Okada et al., 1995) sowie *Neisseria gonorrhoeae* und *meningitidis* (Kallstrom et al., 1997). Für bovines CD46 konnte bislang nur eine Beteiligung an Infektionen mit BVDV nachgewiesen werden.

Porzine Zellen sind zwar empfänglich für BVDV, jedoch ist die Empfänglichkeit ca. 100-fach reduziert, da die Infektion nicht über porcines CD46 vermittelt wird (Krey et al., 2006a). Mit Hilfe so genannter „Hybridrezeptoren“, bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen der CCP-Domänen von porzinem und bovinem CD46 konnten zwei Peptide (E₆₆QIV₆₉ und G₈₂QVLAL₈₇) innerhalb des CCP1 identifiziert werden, die für die Bindung des BVD Virus essentiell sind (Abb. 1b). Die Verkürzung der extrazellulären Domäne hat einen Verlust der Rezeptorfunktion zur Folge, der unabhängig vom entfernten CCP ist. Hingegen hat die Insertion weiterer CCPs kaum einen Einfluss auf die BVDV-Infektion, anders als bei der Infektion mit Masernvirus (Krey et al., 2006a). Dort kommt es infolge der Verlängerung des humanen CD46 zum Verlust der Fusionseffizienz, die auf den größeren Abstand zwischen der Virusbindungsdomäne und der Plasmamembran zurückzuführen ist (Buchholz et al., 1996; Christiansen et al., 2002).

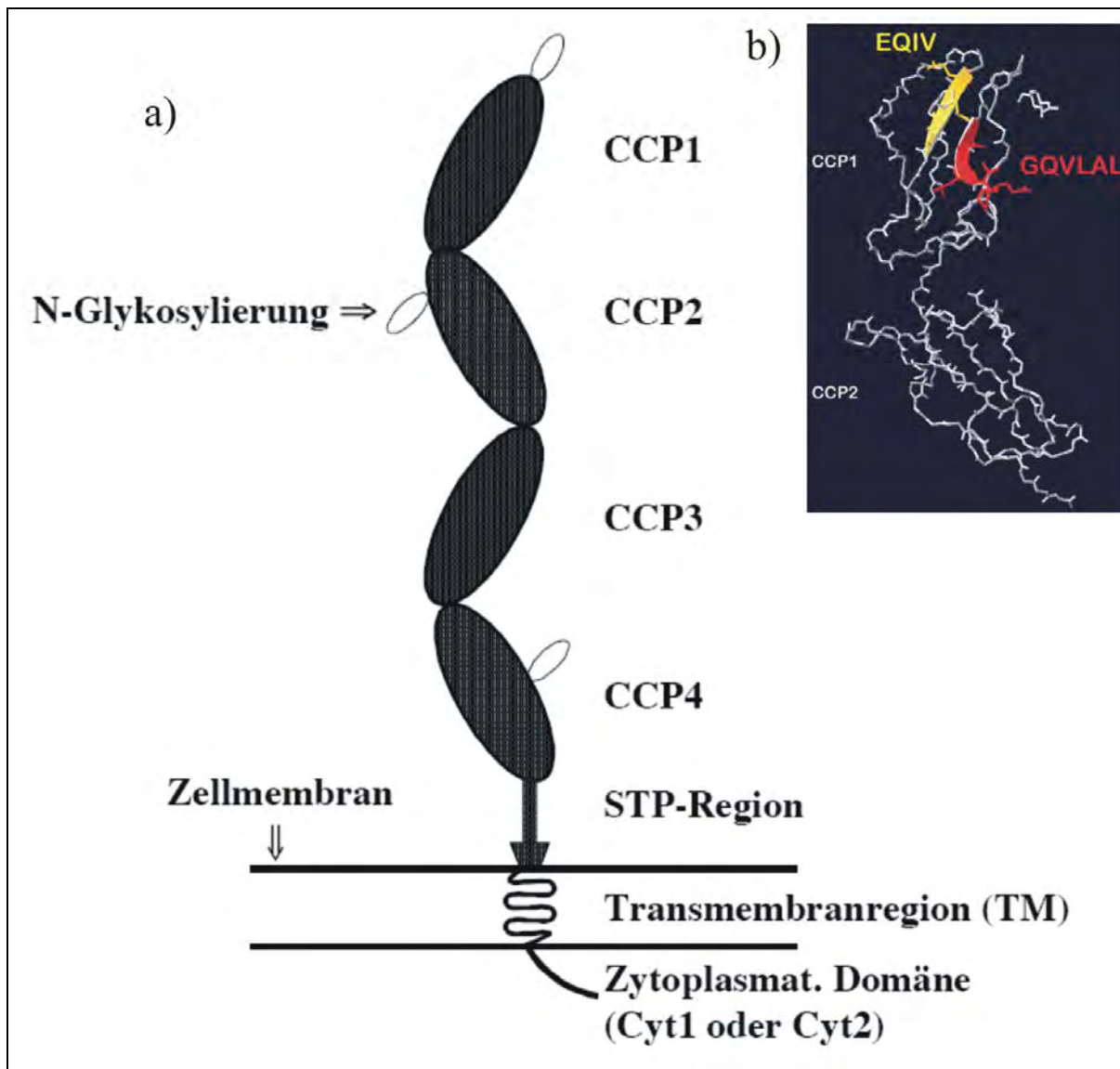


Abb. 1 Aufbau und Struktur des zellulären Rezeptors CD46

a) Schematischer Aufbau des humanen CD46 (aus Himmelreich 2003). Der extrazelluläre Anteil enthält vier CCP-Domänen („Complement Control Proteins“), an denen sich drei potentielle N-Glykosylierungsstellen befinden sowie die STP-Region (Serin-/ Threonin-/ Prolin-reiche Region). Der intrazelluläre Anteil des CD46 wird durch eine der beiden zytoplasmatischen Domänen Cyt1 oder Cyt2 gebildet.

b) Struktur der N-terminalen CCP-Domänen 1 und 2 des bovinen CD46 (aus Krey et al., 2006a). Hervorgehoben sind die Peptide E₆₆QIV₆₉ (gelb) und G₈₂QVLAL₈₇ (rot), die in antiparallel zueinander angeordneten β -Faltblättern im CCP1 lokalisiert sind.

1.3.2 Pestivirale Proteine, die mit zellulären Rezeptoren interagieren

Bei den an der Adsorption beteiligten viralen Liganden der Pestiviren handelt es sich um die Glykoproteine E2 und E^{rns}. Erste Hinweise darauf lieferten gegen E2 und E^{rns} gerichtete, neutralisierende Antikörper (Corapi et al., 1988; Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992). Im Tierexperiment konnte infolge der Gabe von aufgereinigtem E^{rns}- bzw. E2-Antigens eine stabile Immunität erzeugt werden (König et al., 1995). Auch aus Insektenzellen stammendes, gereinigtes E2 und E^{rns} von KSPV inhibierte erfolgreich die Infektion porziner und boviner Zellen mit den Pestiviren KSPV und BVDV (Hulst und Moormann 1997). Allerdings benötigte man für die vollständige Hemmung der KSPV-Infektion eine deutlich höhere Konzentration des Glykoproteins E^{rns} (100µg/ml) als von E2 (10µg/ml). Dieser für die vollständige Inhibition ermittelte deutliche Konzentrationsunterschied deutete darauf hin, dass die beiden viralen Hüllproteine mit unterschiedlichen Zelloberflächenmolekülen interagieren. Sowohl für E^{rns} von BVDV als auch von KSPV konnte eine Bindung an Glukosaminoglykane nachgewiesen werden (Iqbal et al., 2000; Hulst et al., 2001). Bei der molekularen Charakterisierung der Interaktion von BVDV mit CD46_{bov} konnte das Glykoprotein E2 als dessen viraler Ligand identifiziert werden (Himmelreich 2003). Bislang konnte keine Bildung neutralisierender Antikörper gegen das Glykoprotein E1 beobachtet werden, weshalb angenommen wird, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991).

1.3.2.1 Eigenschaften und weitere Funktionen der Strukturproteine E^{rns} und E2

Das Glykoprotein E^{rns} (E = „*envelope*“; rns = „*ribonuclease secreted*“) liegt in infizierten Zellen und Virionen sowohl als disulfidverbrücktes Homo- als auch Heterodimer (E^{rns}-E2) vor. Aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsgrade verfügt es über ein apparentes Molekulargewicht zwischen 44 bis 60kDa (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991; Lazar et al., 2003).

Das E^{rns} ist über nicht kovalente Bindung in die Virushülle eingelagert, kann aber auch aktiv von infizierten Zellen sezerniert werden (Rümenapf et al., 1991b; Thiel et al., 1991; Rümenapf et al., 1993). Für beide Formen konnte eine Ribonukleaseaktivität festgestellt werden (Hulst et al., 1993; Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996; Hausmann et al.,

2004) . Inaktiviert man die Ribonuklease, kommt es zu einer Attenuierung von KSPV und BVDV-2 (Meyers et al., 1999; Meyer et al., 2002), weshalb dem E^{rns} neben der Beteiligung an der Interaktion zwischen Virus und Zelle vermutlich auch eine Bedeutung als Virulenzfaktor zukommt. Neuere Untersuchungen belegen, dass E^{rns} die Interferon-Antwort der Zellen hemmt, indem es doppelsträngige RNS, die bei der Replikation von Pestiviren im Zytoplasma entsteht, bindet oder bei niedrigem pH Wert sogar abbaut (Iqbal et al., 2004).

Im Fokus dieser Arbeit stand das Glykoprotein E2, gegen dessen Epitope die Mehrzahl neutralisierender Antikörper gerichtet ist. Anders als E^{rns} bildet es nicht nur disulfidverbrückte E2-E2 oder E2-E^{rns}-Dimere, sondern kommt zum größten Teil als E1-E2-Heterodimer in der Virushülle eines reifen Virions vor (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991; Branza-Nichita et al., 2001). Mit Hilfe pseudotypisierter Retroviren, die die verschiedenen Glykoprotein-Dimere von KSPV und BVDV enthielten, konnte jedoch gezeigt werden, dass die E1-E2-Heterodimere für den Invasionsprozess essentiell sind, während E^{rns} hierfür entbehrlich ist (Wang et al., 2004; Ronecker et al., 2008).

In infizierten Zellen kann man auch Fusionsproteine aus E2 und p7 detektieren. Dabei handelt es sich nicht um Vorläuferproteine, sondern um eine stabile Proteinspezies (Harada et al., 2000). Die Unterbindung der E2-p7 Spaltung führt zum Verlust der Bildung infektiöser Virionen, während die vollständige Spaltung in einer Reduktion des Titers um den Faktor 10 resultiert. Die Replikation von genomischer RNS ist in beiden Fällen noch möglich (Harada et al., 2000).

Das E2 Protein gehört zusammen mit E1 der Gruppe der Transmembranproteine des Typs 1 an. Sie sind über C-terminal gelegene, hydrophobe Signalsequenzen in der Virushülle verankert (Rümenapf et al., 1993), während ihr N-Terminus die Ektodomäne bildet (Thiel et al., 1991). Weder E2 noch E^{rns} sind an der Oberfläche infizierter Zellen nachweisbar, allerdings konnte bei der subzellulären Lokalisierung der beiden Proteine deren Assoziation mit zytosolischen Membranen, insbesondere des Endoplasmatischen Retikulums (ER) festgestellt werden (Grummer et al., 2001). Dafür verantwortlich ist ein im Membrananker des E2 gelegenes ER Retentionssignal, das kürzlich identifiziert wurde (Köhl et al., 2004).

Die Untersuchung der Interaktion zwischen E2 und dem zellulären Rezeptor CD46_{bov}, deutet darauf hin, dass das E2 in seiner Funktion als viraler Ligand auch die Speziespezifität der Pestiviren beeinflusst. Anders als die Spezies BVDV sind das Virus der klassischen

Schweinepest, das „Border Disease“ Virus und das Isolat Giraffe bei der Invasion der Zelle nicht auf CD46_{bov} angewiesen (Krey et al., 2006a). Infolge der Insertion der Nukleinsäuresequenz des E2 des ovinen Pestivirus „Border Disease“ Virus (BDV) in einen BVDV cDNS Gesamtklon, zeigte dieser auf bovinen und ovinen Zellen einen Phänotyp, der dem des ovinen Pestivirus BDV entsprach (Liang et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse erzielte man mit einer BVDV cDNS Gesamtklonchimäre, in welcher die Nukleinsäuresequenz des BVDV E2 durch die des KSPV E2 ausgetauscht wurde (Reimann et al., 2004). Des Weiteren interagiert BVDV nur mit bovinem CD46, obwohl auch porcine Zellen für BVDV empfänglich sind (Krey et al., 2006a). In einem Zelladsorptionstest mit CD46_{bov} und KSPV E2-exprimierenden Zellen, konnte keine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen beobachtet werden (Himmelreich 2003).

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von KSPV und BVDV E2, stellt man eine Aminosäureidentität von etwa 76% fest (Weiland et al., 1990). Dabei lässt sich das aus etwa 375 Aminosäuren bestehende Polypeptid in konservierte und variable Bereiche aufteilen, wovon Letztere vermutlich für die Unterschiede in der Rezeptornutzung verantwortlich sind. Im E2 sind zwei besonders variable Regionen vorhanden, die aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften wahrscheinlich auf der Außenseite der Virushülle liegen und die Epitope für neutralisierende Antikörper darstellen (Deng und Brock 1992). Entsprechende Regionen wurden auch im E2 des verwandten Hepatitis C Virus (HCV) nachgewiesen (Weiner et al., 1991). Die eine Domäne befindet sich im N-Terminus des E2, die andere im Bereich der Aminosäuren 141-206. In der letztgenannten Domäne konnte mittels einer durch Phagen präsentierten Random-Peptidbibliothek („*phage-displayed random peptide library*“) innerhalb des KSPV E2 das SPTTL Motiv als Epitop des KSPV-neutralisierenden, monoklonalen Antikörpers A18 identifiziert werden (Zhang et al., 2006). Hierbei handelt es sich um ein hoch konserviertes Epitop innerhalb der Spezies KSPV, das bei anderen Pestiviren nicht vorhanden ist und somit eine potentielle Rezeptorbindungsstelle darstellt.

Sowohl das Cysteinmuster als auch die Anzahl potentieller N-Glykosylierungsstellen im E2 von KSPV und BVDV weisen auf konformationelle Unterschiede der Glykoproteine hin. Neben den 15 konservierten Cysteinen und den vier konservierten, potentiellen N-Glykosylierungsstellen kommen im E2 der BVDV-1 und -2 Stämme zwei zusätzliche Cysteine und im KSPV E2 zwei zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstellen vor. Ob die

beiden zusätzlichen Cysteine an der Bildung von inter- bzw. intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind, die eine andere Konformation des E2 Proteins zur Folge haben, wurde bislang jedoch nicht untersucht. Anhand des E2 Proteins des KSPV-Stammes Brescia wurde die Bedeutung von sieben potentiellen O- und N-Glykosylierungsstellen für die Viruspartikel Bildung und die Infektiosität analysiert (Risatti et al., 2007). Dazu wurden die für die Glykosylierungsstellen kodierenden Nukleinsäuren einzeln oder in Kombination mittels ortsgerichteter Mutagenese zerstört und die Auswirkungen anschließend im Tiermodell oder in Zellkultur untersucht. Der Verlust einzelner Glykosylierungsstellen hatte keinen Effekt auf die Infektion *in vitro* oder *in vivo*. Einzige Ausnahme bildete die N-Glykosylierungsstelle an Position 116, deren Mutation zur Attenuierung des Virus führte. Nach der Zerstörung aller Glykosylierungsstellen war das Virus nicht mehr vermehrungsfähig. Dieser Effekt konnte durch die Wiederherstellung der N-Glykosylierungsstelle an Position 185 rückgängig gemacht werden (Risatti et al., 2007).

Es gibt Hinweise darauf, dass KSPV und BVDV E2 einen gemeinsamen Rezeptor nutzen, der es den Viren ermöglicht, unabhängig von CD46_{bov} porcine und bovine Zellen zu infizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die BVDV-Infektion von Zellen porcinen und bovinen Ursprungs nach Präinkubation mit KSPV E2, das in Insektenzellen synthetisiert wurde, gehemmt wurde (Hulst und Moormann 1997). Harada et al. (2000) beobachtete, dass stabil E2 und p7 exprimierende MDBK-Zellen sich nicht mit BVDV-Stamm CP7 infizieren lassen. Des Weiteren konnte die Empfänglichkeit dieser Zellen für BVDV um mehr als das 10-fache reduziert werden, indem diese zuvor mit lentiviralen, pseudotypisierten Partikeln transduziert wurden, die die Ektodomäne des BVDV E2 exprimierten (Tscherne et al., 2008). Mittels Elektroporation infektiöser RNS konnte dieser Effekt umgangen werden (Harada et al., 2000; Tscherne et al., 2008), weshalb vermutet wird, dass das E2 die Invasion von BVDV durch die Interaktion mit einem Rezeptormolekül hemmt. Eine Reduktion der CD46_{bov}-Expression konnte als Ursache allerdings ausgeschlossen werden (Tscherne et al., 2008). Neben der Rezeptorbindung wird vermutet, dass das pestivirale E2 anders als das HCV E2 auch an der Fusion des Virus beteiligt sein könnte. Das E Protein von Mitgliedern des Genus *Flavivirus* (Dengue Virus, „tick-borne encephalitis“ Virus) wird der Gruppe der „class II fusion proteins“ zugeordnet (Kielian und Rey 2006). Sie weisen unter anderem ein internes Fusionspeptid auf, welches nach der Faltung fern vom Transmembrananker liegt (Rey et al., 1995; Lescar et al.,

2001; Kuhn et al., 2002). Basierend auf computergestützten Proteinvergleichen wurde im E1 des HCV und im E2 von KSPV ein hoch konservierter Bereich von 10 Aminosäuren als potentiell Fusionspeptid vorgeschlagen (Garry und Dash 2003). Die experimentelle Bestätigung dieser Daten steht bislang jedoch aus.

1.3.2.1.1 Molekulare Charakterisierung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne im BVDV E2

Für die Charakterisierung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne im E2 wurde das am besten untersuchte BVDV-1 Isolat NADL verwendet (Himmelreich 2003). Da KSPV E2 im Zelladsorptionstest keine Bindung an CD46_{bov} gezeigt hatte, wurden in das BVDV NADL E2 große Sequenzabschnitte (29-184 Aminosäuren) des E2 Proteins von KSPV-Stamm Alfort eingefügt. Die entstandenen NADL/ Alfort E2-Chimären wurden in einem Zelladsorptionstest auf ihre Bindung an CD46_{bov} getestet. Die Eingrenzung des für die CD46_{bov}-Bindung relevanten Aminosäureabschnittes erfolgte nach dem Prinzip des Funktionsverlustes („*loss of function*“). War nach Insertion der von Alfort E2 stammenden Sequenzabschnitte keine Bindung mehr feststellbar, so wurde der Abschnitt verkleinert, bis wieder eine Bindung des chimären NADL E2 an CD46_{bov} nachgewiesen werden konnte. Auf diese Weise gelang die Einengung des CD46_{bov} bindenden Bereichs auf die Aminosäuren 57-293 des NADL E2. Die Insertion der Kodons der Aminosäuren 57-293 des NADL E2 in den Alfort cDNS Gesamtklon (rKSPV) führte zu einem Wirtswechsel. Verglichen mit rKSPV verringerte sich die Empfänglichkeit porziner Zellen für die entstandene rKSPV/ NADL E2₍₅₇₋₂₉₃₎ Gesamtklonchimäre, während sich die Empfänglichkeit boviner Zellen erhöhte (Himmelreich 2003).

Basierend auf Antikörperbindungsdaten und unter Berücksichtigung der für die Proteinfaltung essentiellen Cysteine konnte ein E2-Modell für das Glykoprotein von KSPV erstellt werden, welches drei voneinander unabhängige Bindungsdomänen (Epitop A, B und C) für neutralisierende Antikörper aufweist (van Rijn et al., 1993; van Rijn et al., 1994). Überträgt man dieses Modell auf BVDV, kann die für die Antikörperbindungsdomäne A vorgeschlagene Struktur mit den Daten des Zelladsorptionstests in Einklang gebracht werden (Abb. 2), da sie im Sequenzbereich liegt, der für die BVDV E2-Bindung notwendig ist (Himmelreich 2003). Die Antikörperbindungsdomänen B und C liegen außerhalb des

ermittelten Sequenzbereichs, was darauf schließen lässt, dass sie die Infektion durch eine sterische Behinderung der Rezeptorbindungsdomäne hemmen (Himmelreich 2003).

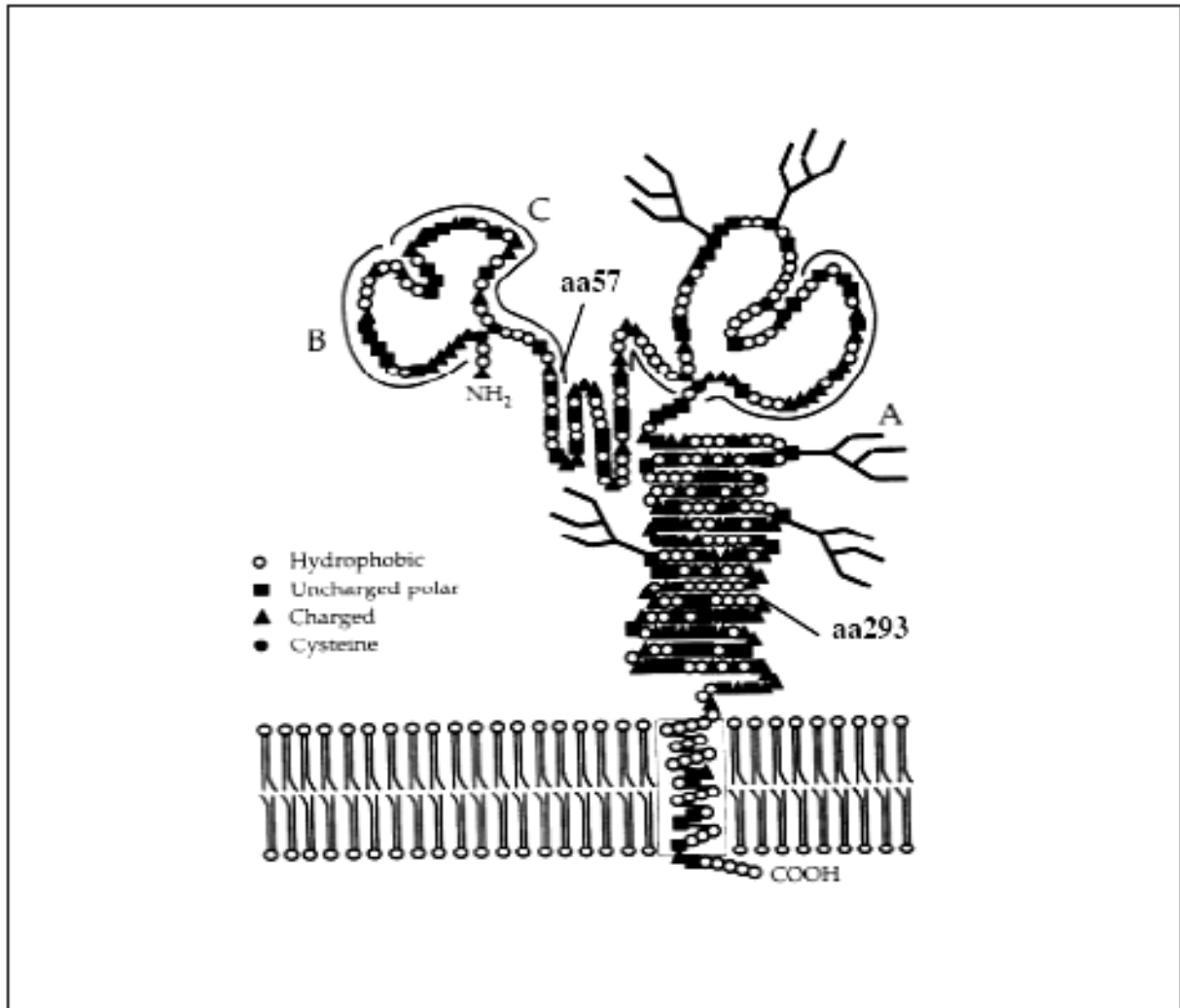


Abb. 2 KSPV Glykoprotein E2-Modell (modifiziert nach van Rijn et al., 1994)

In diesem auf Antikörperbindungsdaten basierendem Modell wurden die Aminosäuren in folgende Gruppen eingeteilt: ○ hydrophobe Aminosäuren (A, G, M, I, L, V, F, W, P); ■ ungeladene Aminosäuren (N, Q, S, T, Y); ▲ geladene Aminosäuren (D, E, K, R, H) und ● Cysteine (C). Zusätzlich wurden die Aminosäure (aa) 57 und 293, die den für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Bereich des NADL E2 umfassen, eingezeichnet.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Während im zellulären Rezeptor CD46_{bov} detaillierte Untersuchungen zur Bestimmung der BVDV-Bindungsdomäne erfolgt sind, ist die entsprechende Domäne im Glykoprotein E2 von BVDV-Stamm NADL nur grob auf 236 Aminosäuren eingegrenzt worden.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Bereich weiter eingengt und die an der CD46_{bov}-Bindung involvierten Aminosäuren/ -sequenzen innerhalb des NADL E2 identifiziert werden. Dazu sollte ein Testsystem etabliert werden, das es ermöglicht, den Einfluss einzelner Aminosäureabschnitte auf die CD46_{bov}-Bindung zu quantifizieren.

Im Einzelnen handelt es sich um folgende Ziele:

- Charakterisierung der potentiellen CD46_{bov}-Bindungsstelle(n) im NADL E2
- Einengung der identifizierten Bereiche auf die für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Aminosäuren
- Etablierung eines quantifizierbaren Bindungstests
- Anwendung des Bindungsassays zur Bestimmung des Einflusses der verschiedenen Aminosäureabschnitte des NADL E2 auf die Bindung an CD46_{bov}

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

BHK-Zellen („Baby Hamster Kidney“ Zelllinie)	ATCC Nummer: CCL-33
MDBK-Zellen („Marbin Darby Bovine Kidney“)	ATCC Nummer: CCL-22
38A ₁ D-Zellen (Schweine-Lymphomzellen)	(Strandstrom et al., 1974)

2.1.2 Prokaryotische Zelllinien

E. coli K12-Stamm HB101 Genotyp *supE44 hsdS20 (r_B⁻m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1GalK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*

2.1.3 Virusstämme

NADL (BVDV-1)	beschrieben in (Collett et al., 1988c)
Alfort (KSPV)	Institut für Virologie, Gießen
Vaccinia Virus MVAT7	GSF, Neuherberg

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper:

mAk 65A	gegen das virale Strukturprotein E2 von BVDV gerichteter monoklonaler Antikörper, erkennt KSPV E2 nach Überexpression in Zellen, Institut für Virologie, Gießen
mAk D5	gegen das virale Strukturprotein E2 von BVDV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk 10B8	gegen das virale Strukturprotein E2 von BVDV und KSPV gerichteter monoklonaler Antikörper, Institut für Virologie, Gießen
mAk A18	gegen das virale Strukturprotein E2 von KSPV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)

mAk Code4	gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3 gerichteter monoklonaler Antikörper, Institut für Virologie, Gießen
mAk BVD/ Ca 17, 26, 27	gegen bovines CD46 gerichtete monoklonale Antikörper (Schelp et al., 1995)

Sekundärantikörper:

Ziege-anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege-anti-Human IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege-anti-Human IgG, Cy3-konjugiert	Fa. Dianova

2.1.5 Enzyme

Antarctic Phosphatase	Fa. New England BioLabs
Dpn I	Fa. Stratagene
<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A	Fa. Alexis Biochemicals
Restriktionsendonukleasen	Fa. Takara, Fa. New England BioLabs
<i>Sp6</i> -RNS-Polymerase	Fa. Takara
T4-DNS-Ligase	Fa. Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs
T4-Polymerase	Fa. Takara
Trypsin	Fa. Sigma

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

1kb-DNS-Leiter	Fa. Invitrogen
Aceton	Fa. Roth
Acrylamid (reinst, 2 x krist.)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. GIBCO
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fa. Alexis Biochemicals
Ampicillin	Fa. Fluka
Bacto-Tryptone	Fa. DIFCO
Bacto-Yeast Extrakt	Fa. DIFCO

β-Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Biotin	Fa. Sigma
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA	Fa. Serva
Chloroform	Fa. Fluka
Desoxy(ribo)nukleotide	Fa. Boehringer Mannheim
1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octan (DABCO)	Fa. Fluka
DMEM-Pulver	Fa. Invitrogen
Doxizykin	Fa. ICN
DTT (Dithiothreitol)	Fa. Fermentas
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraacetat)	Fa. Merck
Essigsäure	Fa. Roth
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim
Formaldehyd	Fa. Merck
G418 Sulfat	Fa. Calbiochem
„Gentle Ag/ Ab Elution Buffer, pH6,6“	Fa. Pierce
Glyzin	Fa. Fluka
Glyzerin	Fa. Sigma
Harnstoff	Fa. United States Biochemical
„Human Placenta Ribonuclease Inhibitor“	Fa. Takara
Hypoxanthin	Fa. Sigma
Isopropanol	Fa. Fluka
L-Alanin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Prolin	Fa. Fluka
Magermilchpulver	Fa. Frema
Methanol	Fa. Fluka
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka
Octylglukosid	Fa. Calbiochem
Oligonukleotide	Fa. Operon
Orange-G	Fa. Fluka
Paraformaldehyd	Fa. Fluka
Penicillin	Fa. Sigma
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	Fa. Stratagene

Phenol	Fa. Appligene
Phenolrot	Fa. Fluka
Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol)	Fa. Sigma
Ponceau Rot	Fa. Roth
„ <i>prestained protein marker</i> “	Fa. Invitrogen
Puromycin dihydrochlorid	Fa. Alexis Biochemicals
Rotiblock [®]	Fa. Roth
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
SequaGel [®] XR Monomer Solution	Fa. National Diagnostics
SequaGel [®] Complete Buffer	Fa. National Diagnostics
Streptomycin	Fa. Sigma
Superfect [®] Reagent	Fa. Qiagen
TEMED	Fa. Fluka
TMB (Tetramethylbenzidine)	Fa. Applichem
Tris	Fa. Roth
Triton X-100	Fa. Fluka
Trypanblau-Färbelösung	Fa. Cambrex
TWEEN 20	Fa. Fluka
Wasser, RNase frei	Fa. Roth
Wasserstoffperoxid	Fa. Roth

Weitere hier nicht im Einzelnen aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Serva, Sigma und Roth mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

2.1.7 Kits

BCA [™] Protein Assay Kit	Fa. Pierce
DNA Gel Extraction Kit	Fa. Millipore
Nukleobond [®] AX100 [™] Säulen	Fa. Millipore
pGEM-T [®] Vektor System I	Fa. Promega
Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTP [™]	Fa. Amersham

Vybrant™ Cell Adhesion Assay Kit (V-13181)	Fa. Invitrogen
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN™)	Fa. Pierce

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Fa. Braun
Elektroporationsküvetten (Ø 2mm)	Fa. BioRad
ELISA-Platte	Fa. Nunc
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Glasdeckgläschen (Ø 12mm)	Fa. MAGV
Handschuhe rotiprotect® Latex	Fa. Roth
Handschuhe rotiprotect® Nitril	Fa. Roth
Hi Trap 1ml Protein A Säule	Fa. Amersham
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon, Fa. Nunc
Nitrozellulosemembran „pure nitrocellulose“	Fa. Pall
Nukleobond AX 100-Säulen	Fa. Macherey & Nagel
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilm Biomax	Fa. Kodak
Sterilfilter 0,45µm	Fa. Millipore
Ultrafiltrator	Fa. Amicon
Zellophanfolie	Fa. Roth

2.1.9 Geräte

Bakterienschüttler	Fa. Infors
BioRad Gene Pulser® II	Fa. BioRad
Brutschränke mit CO ₂ Begasung	Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert
CCD-Mikroskopkamera (F-View II) und Dokumentationssoftware	Fa. Soft-Imaging Systems
Dialyseschlauch 7,000 MWCO	Fa. Pierce
ELISA Reader Spectra II	Fa. SLT
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule	Fa. Zeiss
Gefrierschränke	Fa. Liebherr

Geldokumentationssystem (DNS Elektrophorese)	Fa. MWG Biotech
Gelelektrophoresekammern (DNS)	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblöcke	Fa. Eppendorf, Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Kühlwasserbad RM6	Fa. LAUDA
Kühlzentrifuge Laborfuge 400R	Fa. Heraeus
Magnetrührer	Fa. IKA-Works, INC
Mehrkanalpipette	Fa. Biohit
Mikroliterpipetten (10µl, 20µl, 200µl, 100µl)	Fa. Eppendorf, Fa. Gilson
Mikroskop DMI 6000 CS Trino und Verarbeitungssoftware TCS SP-5	Fa. Leica
Mikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Mini Protean	Fa. BioRad
Nass-Blot-Apparatur	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
<i>Neubauer</i> Zählkammer	Fa. Assistent
PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400	Fa. Perkin Elmer
PCR-Maschine Mastercycler Gradient	Fa. Eppendorf
Phosphospektrophotometer GeneQuant II	Fa. Pharmacia
Proteingelelektrophoresekammern	Fa. Hoefer,
Pumpe: Varioperpex [®] II Pump	Fa. LKB Bromma
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Tischzentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Fa. Heraeus
Schüttler	Fa. Edmund Bühler
Sequenzgelelektrophoreseapparaturen	Fa. LICOR
Sequenziergerät LICOR 4000 L	Fa. LICOR
Spannungsgeräte	Fa. BioRad, Fa. Stratagene
Sterilbank: LaminAir	Fa. Heraeus
Vortexer	Fa. IKA, Fa. Works
Waagen	Fa. Mettler

Wasserbad

Fa. Braun

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco's MEM

mit Zusätzen (10l): Dulbecco's MEM Pulvermedium; GIBCO (Invitrogen Corporation)

0,0178g/l	L-Alanin
0,07g/l	Glycin
0,075g/l	L-Glutaminsäure
0,025g/l	L-Prolin
0,1mg/l	Biotin
0,025g/l	Hypoxanthin
3,7g/l	NaHCO ₃

Vor Gebrauch wurden 10% fötales Kälberserum (FKS; Fa. PAA), 100 000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin zugegeben.

Trypsinlösung:	8,0g/l	NaCl
	0,2g/l	KCl
	1,44g/l	Na ₂ PO ₄
	0,2g/l	KH ₂ PO ₄
	2,5g/l	Trypsin (1:250)
	1,23g/l	Versen (EDTA)
	0,016g/l	Phenolrot
	mit 1N HCl auf pH 7,4 einstellen	

PBS defiz.:	0,25g/l	KCl
	1,8g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,25g/l	KH ₂ PO ₄
	10g/l	NaCl

PBS:	PBS defiz.	
	0,1g/l	CaCl ₂
	0,1g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Zellen:	SK6, MDBK, BHK, BHK Tet on und 38A ₁ D-CD46 _{bov}
Medien:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika + 100µg/ml G418
Lösung:	Trypsin
Geräte:	Brutschränke mit CO ₂ Begasung, Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert Sterilbank: LaminAir, Fa. Heraeus

Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken durchgeführt. Nachdem die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen waren, erfolgte die Passage der Zellen. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit 5ml Trypsinlösung inkubiert. Bevor sich die Zellen von der Platte ablösen, wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen noch zwei bis drei Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach Aufnahme der Zellen in Medium wurden sie in geeigneten Verdünnungen auf frische Gewebekulturschalen verteilt. Um 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen zu passagieren, konnte auf eine Trypsinbehandlung vor dem Abspülen der Zellen verzichtet werden, da diese Zellen nicht fest am Boden der Kulturschale haften. Zur Kultivierung der BHK Tet on Zellen wurde dem Medium 100µg/ml G418 zugesetzt.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Lösung:	Trypanblau-Färbelösung, Fa. Cambrex
Geräte:	Neubauer Zählkammer, Fa. Assistent Mikroskop Eclipse TS 100, Fa. Nikon

Zellen aus einer Suspension wurden 1:10 in Trypanblau-Färbelösung verdünnt und in einer Zählkammer nach *Neubauer* unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Auszählung berücksichtigte 4 große Quadrate der Kammer (Diagonale). Gezählt wurden nur lebende Zellen ohne sichtbare Blaufärbung. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl (Zellen/ml) ermittelt.

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 4 \times V \times 1000 / 3.2$$

n = Zellen in 4 Großquadraten

V = Verdünnungsfaktor

2.2.1.4 Transfektion von zirkulärer Plasmid-DNS

Zellen:	BHK
Virus:	Vaccinia MVAT7
Medien:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika Dulbecco's MEM ohne FKS ohne Antibiotika
Lösung:	Trypsin
Reagenz:	Superfect [®] Reagent, Fa. Qiagen
Verbrauchsmaterialien:	6 „well“ Gewebekulturschale, Fa. Falcon 48 „well“ Gewebekulturschale, Fa. Falcon Mikrotiterplatten, Fa. Nunc

Am Vortag wurden BHK-Zellen so auf 6 „well“/ 24 „well“ Gewebekulturschalen/ Mikrotiterplatten ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 80% aufwiesen. Für die Transfektion von Plasmid-DNS wurde die kationische Trägersubstanz Superfect[®] verwendet. Je nach Anzahl der zu transfizierenden Zellen, wurden zunächst 2/ 0,5/ 0,12µg DNS mit 10/ 2,5/ 0,7µl Reagenz und 50/ 15/ 10µl Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500/ 200/ 40µl Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika zu der Reaktion gegeben. Anschließend wurde das Medium der BHK-Zellen abgesaugt und durch die Reaktion ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3h im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit Dulbecco's MEM inklusive 10% FKS und Antibiotika. Die Zellen wurden dann für weitere 48h bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Enthält das Vektorplasmid für die zu transfizierende DNS einen T7-RNS-Polymerase-Promotor (z.B. pcDNA3) kann die Proteinexpression gesteigert werden, indem die Zellen vor der Transfektion mit

dem rekombinanten Vaccinia Virus MVAT7 infiziert werden. Das Vaccinia Virus verfügt über eine T7-DNS abhängige RNS-Polymerase, welches die mRNS Synthese ausgehend vom transfizierten Plasmid ermöglicht (Sutter et al., 1995). Da die Transkription der Plasmide bereits im Zytoplasma stattfindet, kann die Proteinexpression deutlich gesteigert werden. Die BHK-Zellen wurden eine Stunde vor der Transfektion mit MVAT7 infiziert und im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.5 Elektroporation von RNS in MDBK-Zellen

Zellen:	MDBK
Medium:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika
Lösungen:	Trypsin, PBS defiz.
Geräte:	BioRad Gene Pulser® II, Fa. BioRad Elektroporationsküvetten (Ø 2mm), Fa. BioRad Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus
Verbrauchsmaterialien:	6 „well“ Gewebekulturschalen, Fa. Falcon

Die Transfektion von RNS in MDBK-Zellen erfolgte via Elektroporation. Dabei wird mittels eines kurzen, elektrischen Impulses die Zellmembran kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass die RNS in das Zellinnere gelangen kann. Für die Transfektion wurden etwa 5×10^6 MDBK-Zellen verwendet, die am Vortag in einer Verdünnung von 1:3 ausgesät worden waren. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin abgelöst und mit FKS-haltigem Zellkulturmedium gewaschen (Zentrifugation bei $194 \times g$ für 2min). Danach wurde das Zellpellet in PBS defiz. aufgenommen und gelöst, bevor sich eine weitere Zentrifugation bei $194 \times g$ für 2min anschließt. Das Pellet wurde erneut in PBS defiz. gelöst (pro Elektroporationsansatz 300µl PBS defiz.) und auf die Elektroporationsküvetten (Ø 2mm) verteilt. Direkt nach der Zugabe von RNS (1µg RNS/ Elektroporationsansatz) erfolgte die Elektroporation bei 0,18kV, 950µF und unendlichem Widerstand. Die Ansätze wurden in 2ml FKS-haltigem Zellkulturmedium aufgenommen und auf 6 „well“ Gewebekulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin für 24h im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.6 Titration zur Bestimmung des Virustiters

Zellen:	MDBK
Viren:	Stamm Alfort (KSPV) Stamm NADL (BVDV-1)
Medium:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika

Lösung: Trypsin
Verbrauchsmaterial: Mikrotiterplatte, Fa. Nunc

Für die Virustitration wurde mit FKS-haltigem Zellkulturmedium eine Verdünnungsreihe (1:10) von 10^{-1} bis 10^{-8} hergestellt. 100µl jeder Verdünnung wurden in jeweils 4 Vertiefungen einer 96 „well“ Platte pipettiert. Pro Vertiefung wurden anschließend 100µl einer Zellsuspension (etwa $2,2 \times 10^5$ MDBK-Zellen/ml in Kulturmedium mit 10% FKS und Antibiotika) zugegeben. Die Inkubation des Ansatzes im Brutschrank erfolgte bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre für 24 Stunden. Die Titration wurde mittels des indirekten Immunperoxidase Assays ausgewertet (2.2.1.7.1). Der Titer wurde gemäß der Formel von Spaermann und Kärber berechnet und als TCID₅₀ angegeben (Kärber 1931).

2.2.1.7 Indirekter immunhistochemischer Nachweis

2.2.1.7.1 Indirekter Immunperoxidase Assay

Zellen: MDBK, BHK, BHK Tet on pGRS 27
Antikörper: Primärantikörper, Hybridomüberstand (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20):
mAk Code4 (1:5), mAk 65A (1:5), mAk 10B8 (1:5), mAk D5 (1:10), mAk A18 (1:5), mAk BVD/ Ca 17, 26, 27 (1:10)
Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20):
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG (1:1000)
Lösungen: Substrat: 9,25ml Aminoethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid (4mg/ml)
0,75ml 50mM Na-Acetat pH 5,2
5µl H₂O₂ (30%)
Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS
Triton X-100 (0,1%)
PBS defiz.
PBS + 0,01% Tween 20
Gerät: Mikroskop Eclipse TS 100, Fa. Nikon

Die infizierten bzw. transfizierten Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS defiz. für 20min bei 4°C mit PFA (4%) fixiert und danach ein weiteres Mal mit PBS defiz. gewaschen. Zum Nachweis der viralen Proteine mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Hierfür wurde Triton X-100

(0,1%) verwendet, womit die Zellen für 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS defiz. gewaschen, bevor die Inkubation der Zellen (1h bei 37°C) mit dem für den Proteinnachweis benötigten Antikörpern erfolgte (2.1.4). Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Zellen zweimal unter kräftigem Schütteln mit PBS + 0,01% Tween 20 gewaschen. Abschließend wurde ein weiterer 2-minütiger Waschschriff durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper in der oben angegebenen Konzentration verwendet. Auch mit diesem wurden die Zellen 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut gewaschen. Die Antikörperbindung detektierte man durch Zugabe von Substrat, welches durch die Peroxidase zu einem wasserunlöslichen, roten Niederschlag umgesetzt wurde. Die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises erfolgte mittels eines Lichtmikroskops.

Der Nachweis der Proteine an der Zelloberfläche erforderte keine Permeabilisierung der Zellen. Daher konnte im Anschluss an die Fixierung direkt mit der ersten Antikörperinkubation begonnen werden.

2.2.1.7.2 Zell-ELISA zur Bestimmung der E2-Expression

Zellen: BHK

Antikörper: Primärantikörper, Hybridomüberstand (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20):

mAk 65A, mAk 10B8, mAk D5, mAk A18 (1:20)

Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA):

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG (1:8000)

Lösungen: TMB-Substrat:

9ml TMB-Puffer (100mM Na-Acetat pH 5,2)

1ml TMB-Substrat-Stock (10mg TMB (Tetramethylbenzidine, Fa. Applichem)
in 4ml DMSO)

1,5µl H₂O₂ (30%)

Stopplösung: H₂SO₄ konz. 1:4 verdünnt in H₂O_{bidest}

Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS

PBS defiz.

PBS + 0,01% Tween 20

Geräte: ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT

Mehrkanalpipette, Fa. Biohit

Die Expressionseffizienz der verschiedenen E2-Chimären wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Dazu wurden sechzehn Stunden vor der Vaccinia-induzierten Expression (2.2.1.4) je $5,6 \times 10^4$ BHK-Zellen/ „well“ einer Mikrotiterplatte ausgesät. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden diese einmal mit PBS defiz. gewaschen und dann für 20min bei 4°C mit PFA (4%) fixiert. Vor der Inkubation der Zellen mit den anti-E2-Antikörpern (1h bei 37°C) erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS defiz.. Für den E2-Nachweis standen die monoklonalen Antikörper 65A, 10B8, D5 und A18 zur Verfügung. Allerdings erwies sich der mAk 65A am besten geeignet, da er alle chimären E2 Proteine erkannte. Der Primärantikörper wurde für den ELISA 1:20 mit PBS + 0,01% Tween 20 verdünnt. Nach zwei Waschschriffen unter kräftigem Schütteln und einem 2-minütigen Waschschriff mit PBS + 0,01% Tween 20 wurde der Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben. Dem 1:8000 verdünnten Peroxidase-gekoppelten anti-Maus IgG-Antikörper wurde BSA (0,2%) zugegeben, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nachdem die BHK-Zellen 1h bei 37°C inkubiert worden waren, wurden sie erneut dreimal gewaschen. Die Antikörperbindung detektierte man durch Zugabe von Substrat, welches mit der Peroxidase reagierte und somit zu einem Farbumschlag führte. Die Reaktion wurde nach einer Minute mit H_2SO_4 (1:4 verdünnt) abgestoppt und die optische Dichte mittels des ELISA Readers bestimmt. Die für die NADL E2-Expression ermittelten OD-Werte wurden dabei als oberer Schwellenwert festgesetzt, bei dem die E2-Expression 100% beträgt.

2.2.1.8 Zelladsorptionstest

Zellen: 38A₁D-CD46_{bov}, BHK
Medium: Dulbecco's MEM ohne FKS, ohne Antibiotika
Gerät: Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss

Die Durchführung des Zelladsorptionstests erfolgte in Mikrotiterplatten. Zunächst wurden die BHK-Zellen mit Vaccinia MVAT7 mit einer Multiplizität von 1 infiziert und anschließend mit den für die chimären E2 Proteine kodierenden Plasmiden transfiziert (2.2.1.4). Fünf Stunden nach der Transfektion wurden Calcein-markierte 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen (2.2.1.9) zu den E2-exprimierenden BHK-Zellen gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünf Waschschriffe mit angewärmtem Medium, bevor der Zelladsorptionstest mittels eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet wurde. Jede E2-Chimäre wurde jeweils im Duplikat auf die Adsorption von CD46_{bov}-exprimierenden 38A₁D-Zellen untersucht. Pro Testansatz wurden jeweils 5×10^5 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen benötigt.

2.2.1.9 Zytoplasmatische Markierung von Zellen

Zellen:	38A ₁ D-CD46 _{bov}
Medium:	Dulbecco's MEM ohne FKS, ohne Antibiotika
Lösung:	PBS defiz.
Reagenz:	Vybrant TM Cell Adhesion Assay Kit (V-13181), Fa. Invitrogen
Gerät:	Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus

Die Markierung von Zellen mit dem VybrantTM Cell Adhesion Kit basiert auf der Methode von Akeson und Woods (Akeson und Woods 1993). Die darin enthaltene Reagenz Calcein AM wird nach der Aufnahme in Zellen von Esterasen gespalten und in stark fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Dabei handelt es sich um einen pH Wert unabhängigen, zytoplasmatischen Zellfarbstoff.

Nach der Bestimmung der Anzahl benötigter 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen wurde diese von der Gewebekulturschale abgelöst und 2min bei 194 x g pelletiert. Dann erfolgt die Resuspension der Zellen in 10ml PBS defiz.. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, bevor die 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in Medium ohne Antibiotika und FKS aufgenommen wurden. Pro ml der Zellsuspension wurden jeweils 5µl der Reagenz Calcein AM hinzugegeben (Endkonzentration 5µM). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation und Resuspension in angewärmtem Medium gewaschen und überflüssiger Farbstoff entfernt.

2.2.1.9.1 Plaqueassay zur Bestimmung des hemmenden Effekts von CD46_{bov}-Fc_{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen

Zellen:	MDBK
Viren:	Stamm NADL Stamm BVDV
Medien:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika
Verbrauchsmaterialien:	24 „well“ Gewebekulturschalen, Fa. Falcon

Die MDBK-Zellen wurden am Vortag so auf 24 „well“ Gewebekulturschalen ausgesät, dass zum Zeitpunkt des Experiments ein subkonfluenter Zellrasen (Zelldichte ca. 80%) vorhanden war.

Präinkubation von Virus und CD46_{bov}-Fc_{hum}:

Je 10² TCID₅₀ von BVDV (NADL) und KSPV (Alfort) wurden in 100µl Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika aufgenommen und mit 100µl TBS (Kontrolle) oder mit 10µg, 5µg bzw. 1µg CD46_{bov}-Fc_{hum} in 100µl TBS gemischt. Die Inkubation erfolgte für 1h bei Raumtemperatur.

Inkubation der Zellen:

Das Gemisch aus Virus und CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde auf die MDBK-Zellen gegeben. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abgesaugt und gegen Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte die Fixierung der Zellen mit PFA (4%) für den indirekten Immunperoxidase Assay (2.2.1.7.1).

Berechnung der Hemmungseffizienz:

Die Präinkubation des Virus mit CD46_{bov}-Fc_{hum} führte zu einer Reduktion der Zahl gefärbter „plaques“. Die Hemmungseffizienz wurde berechnet, indem für jedes Virus, welches nicht mit CD46_{bov}-Fc_{hum} präinkubiert wurde, die „plaque“ Anzahl auf MDBK-Zellen als 100% angenommen wurde. Die „plaque“ Anzahl, welche nach Präinkubation des Virus mit den verschiedenen Mengen an CD46_{bov}-Fc_{hum} bestimmt wurde, konnte dann in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, angegeben werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium: 10g/l Trypton
 5g/l Hefeextrakt
 10g/l NaCl
 mit 1N NaOH auf pH 7,5 einstellen
Substanzen: Agar-Agar, Fa. DIFCO; Ampicillin, Fa. Fluka
Geräte: Schüttler, Fa. Infors

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5%-iger Agar zugesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert. Durch den Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum Medium konnte eine Selektion von plasmidhaltigen Bakterien mit entsprechenden AB-Resistenzgenen erreicht werden. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler mit 185rpm in LB-Medium kultiviert. Auch hier erfolgte zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien der Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum LB-Medium.

2.2.2.2 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen wurden je nach Verwendungszweck Mini- (bis 10µg DNS) oder Midipräparationen (bis 100µg DNS) durchgeführt.

Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1:	50mM	Tris-HCl, pH 8,0
Lösung P1/ RNase:	Lösung P1	
	0,1mg/ml	RNase A
Lösung P2:	0,2M	NaOH
	1%	SDS
Lösung P3:	2,55M	Kalium-Acetat, pH 5,5
Gerät:	Tischzentrifuge 5414C, Fa. Eppendorf	

Die Präparationen kleinerer DNS-Mengen (bis 10µg) wurden durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Eine 2ml Bakterienkultur wurde über Nacht inkubiert. 1,5ml der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge mit ca. 10000 x g 2min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Sediment in 200µl der Lösung P1/ RNase resuspendiert. Dann wurden 200µl der Lösung P2 hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200µl der Lösung P3 zugegeben, die Suspension wurde gemischt und nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNS wurde mit 500µl Isopropanol präzipitiert und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNS wurde in 50µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

Midipräparation (Macherey & Nagel)

Lösungen P1-P3 wie für Minipräparation beschrieben

Puffer N2:	100mM	Tris
	900mM	KCl
	15%	Ethanol, Fa. Fluka
	mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,3 einstellen	

Puffer N3:	100mM	Tris
	1150mM	KCl
	15%	Ethanol, Fa. Fluka
	mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,3 einstellen	
Puffer N5:	100mM	Tris
	1000mM	KCl
	15%	Ethanol, Fa. Fluka
	mit H ₃ PO ₄ auf pH 8,5 einstellen	
Verbrauchsmaterialien:	Nukleobond AX 100-Säulen, Fa. Macherey & Nagel	
Geräte:	Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus	
	Tischzentrifuge 5414C, Fa. Eppendorf	

Zur Präparation größerer DNS-Mengen (bis 100µg) aus 50ml Übernachtskultur wurden Nukleobond AX 100-Säulen verwendet. Die Bakterien wurden in „Bluecaps“ für 15min bei 3939 x g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 5ml der Lösung P1/ RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 5ml der Lösung P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 5ml der Lösung P3 hinzu gegeben und der Ansatz erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt. Während der folgenden 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Präzipitation der bakteriellen Proteine sowie der chromosomalen DNS. In der Zwischenzeit wurde eine Nukleobond AX 100-Säule mit 2,5ml der Lösung N2 äquilibriert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration entfernt und die klare, plasmidhaltige Phase auf die äquilibrierte Säule gegeben. Hiernach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10ml der Lösung N3 gewaschen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNS durch Zugabe von 3ml der Lösung N5 eluiert. Jeweils 1ml Eluat wurde mit 700µl Isopropanol präzipitiert und die pelletierte DNS anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNS wurde je nach Größe des Pellets in 50-75µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.2.2.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien: *E. coli* K12-Stamm HB101

Medien:

TFB I:	30mM	KOAc
	100mM	RbCl
	10mM	CaCl ₂

	50mM	MnCl ₂
	15%	Glyzerol
	mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren	
TFB II:	10mM	MOPS
	75mM	CaCl ₂
	10mM	RbCl
	15%	Glyzerol
	mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren	

Um *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNS effektiv zu transformieren, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Dazu wurden 250ml LB-Medium mit 1:100 einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5min bei 3939 x g, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 100ml eisgekühltem TFB I-Medium aufgenommen, resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (5min bei 3939 x g, 4°C), das Pellet in 10ml eiskaltem TFB II resuspendiert, für 1h auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -70°C eingefroren und gelagert. Zur Transformation wurden pro Ansatz 50µl kompetenter Bakterien mit etwa 50ng Plasmid-DNS oder 10-15µl Ligationsansatz für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90s bei 37°C und 3-4 Minuten auf Eis wurden die Transformationsansätze mit LB-Medium auf 0,5ml aufgefüllt, 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 12 bis 18h inkubiert, einzelne Kolonien wurden zum Animpfen von Kulturen für Mini- oder Midipräparationen (2.2.2.2) verwendet.

2.2.2.4 Phenol/ Chloroform Extraktion von DNS

Lösung: Phenol/ Chloroform 1:1, Fa. Appligene/ Fa. Fluka

Gerät: Tischzentrifuge Biofuge Pico, Fa. Heraeus

Eine Phenol/ Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Proteine reichern sich hierbei in der Interphase an.

Zur Nukleinsäurelösung wurde ein Volumen Phenol/ Chloroform-Lösung (1:1) gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für ca. 5min in einer Tischzentrifuge bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und

konnte vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurde sie mit Ethanol bzw. Isopropanol präzipitiert (2.2.2.5)

2.2.2.5 Ethanolpräzipitation von DNS/ RNS und Isopropanolpräzipitation von DNS

Lösungen: 100% bzw. 70% Ethanol, Fa. Fluka
100% Isopropanol, Fa. Fluka
3M Na-Acetatlösung, pH 5,2, Fa. Merck
Gerät: Tischzentrifuge Biofuge Pico, Fa. Heraeus

Um Nukleinsäuren aus einer Lösung auszufällen, wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung 2,5 Volumen eiskaltes, 100%-iges Ethanol und 1/10 Volumen 3M Na-Acetatlösung, pH 5,2 zugesetzt (0,3M Endkonzentration). Das Salz unterstützt die Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäure und erleichtert die Fällung. Die Präzipitation erfolgte bei -20°C für ca. zwei Stunden. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation (10000 x g, 20min, 4 °C) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach Lufttrocknung wurde die DNS oder die RNS in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest} resuspendiert.

Für die Isopropanolpräzipitation von DNS wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung das 0,7-fache Volumen Isopropanol und das 0,1-fache Volumen Na-Acetatlösung, pH 5,2 zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und zur Präzipitation und Pelletierung der DNS bei 4°C für 15min bei 10000 x g zentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.2.2.6 Quantifizierung von DNS

Gerät: Phosphospektrophotometer GeneQuant II, Fa. Pharmacia

Um den DNS-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption eines Aliquots in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer gemessen. Hierzu wurde die DNS-Lösung zuvor 1:100 mit H₂O_{bidest} verdünnt und anschließend die Absorption gegen H₂O als Referenzwert ermittelt.

1 OD₂₆₀ entspricht ca. 50µg/ml dsDNS
40µg/ml ssDNS
33µg/ml ssOligonukleotid (Sambrook et al., 1989)

Es ergeben sich folgende Gleichungen:

DNS-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Messwert OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 50

RNS-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Messwert OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 40

2.2.2.7 DNS- bzw. RNS-Agarose Gelelektrophorese

Puffer:

6 x DNS bzw. RNS-Auftragspuffer: 0,25% Bromphenolblau (w/v)

30% Glycerin (v/v)

50 x TAE-Puffer:

242g Tris

57,1ml Eisessig

100ml EDTA, 1,5M, pH 8,0

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1Liter auffüllen

Substanzen:

10mg/ml Ethidiumbromid-Lösung

DNS-Längenstandard: 1kb-DNS-Leiter, Fa. Invitrogen

Gerät:

Nukleinsäure Elektrophoresekammern, Eigenbau JLU

Gießen

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten bzw. RNS-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8-2%-igen Agarosegelen (w/v) bei konstanter Spannung (Feldstärke 4-8V/cm). Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer, der mit 250 $\mu\text{g/l}$ Ethidiumbromid (EtBr) versetzt war. Das im Puffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose mit einem entsprechenden Volumen 1 x TAE/ EtBr versetzt, durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in die „*Schlitten*“ der Elektrophoresekammern gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1 x TAE-Puffer/ EtBr aufgefüllt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa 1/10 Volumen DNS bzw. RNS-Auftragspuffer gemischt. Nach dem Lauf wurden die DNS- bzw. RNS-Fragmente des Gels unter UV-Licht an einem Transilluminator analysiert, photographisch dokumentiert oder die entsprechenden DNS-Banden für eine Aufreinigung aus der Agarose ausgeschnitten.

2.2.2.8 Aufreinigung von DNS-Fragmenten

Material: Ultrafree[®]-DA-Säulen, Fa. Millipore

Gerät: Tischzentrifuge 5415C, Fa. Eppendorf

Die Aufreinigung der DNS aus Agarose erfolgte mit Hilfe eines Kits (Ultrafree[®]-DA). Dieses Kit ist geeignet, um DNS von 100-10000 Basenpaaren aus Agarosegelen für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu extrahieren. Zur Aufreinigung wurde das DNS-haltige Agarosegelstück ausgeschnitten und in eine Säule („gel nebulizer“) überführt. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 5000 x g, bei der feste Gelbestandteile in der Säule zurückgehalten wurden. Das Filtrat bestand aus extrahierter DNS und Agarosegelpuffer und konnte direkt weiter verwendet werden.

2.2.2.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Enzyme: Restriktionsendonukleasen, Fa. New England BioLabs; Fa. Takara

Antarctic Phosphatase, Fa. New England BioLabs

T4-DNS-Ligase, Fa. Fermentas

T4-Polynukleotidkinase, Fa. New England BioLabs

Substanz: 100mM ATP

Die Ligation von DNS-Fragmenten, z.B. das Einfügen eines DNS-Fragments in ein Vektorplasmid, erfolgte mit T4-DNS-Ligase. Die T4-DNS-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3' OH mit der 5' PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNS durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Verbrauch von ATP. Um ligierbare Enden zu erhalten, mussten zuvor die Ligationspartner mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gleicher Spaltspezifität behandelt werden. Eine intramolekulare Religation des linearisierten Vektorplasids verhinderte man, indem der Vektor zusätzlich durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert wurde. Eine Religation kann stattfinden, wenn das Plasmid nur von einem Restriktionsenzym gespalten wird, d.h. selbstkomplementäre 3'- und 5'-Enden entstanden sind. Der andere Ligationspartner muss entsprechend phosphorylierte Enden aufweisen, damit die Ligation erfolgen kann. Die Phosphorylierung konnte durch die T4-Polynukleotidkinase mit ATP als Phosphatgruppendonator katalysiert werden. Ligationen wurden in einem Volumen von 15µl in 1 x Ligationspuffer und mit 1U T4-DNS-Ligase angesetzt. Die Menge der Ligationspartner wurde über den Vergleich der

Bandenintensitäten auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bestimmt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert sollte in etwa 1:3 betragen. Die Ligation fand bei 25°C für 2h statt.

2.2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzym: *Pfu*-DNS-Polymerase, Fa. Stratagene
 Reagenzien: 10 x *Pfu*-Puffer, Fa. Stratagene
 dNTPs [10mM], Fa. Boehringer Mannheim
 Plusstrang-Primer bzw. Minusstrang-Primer [100µM], Fa. Operon
 Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer
 PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur enzymatischen, selektiven Amplifikation von DNS, wobei selbst sehr geringe Mengen an DNS stark vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNS komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNS, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNS-Doppelstranges durch Erhitzen lagern sich beide Oligonukleotide bei Absenken der Reaktionstemperatur an die DNS an („*annealing*“). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen Polymerase, z.B. *Taq*-DNS-Polymerase, als Start für die DNS-Synthese („*elongation*“).

Durchführung:

Ein PCR Standardansatz von 50µl wies folgende Zusammensetzung auf:

10 x PCR-Puffer	5µl
dNTPs [10mM]	1µl
Plusstrang-Primer [100pmol/µl]	0,5µl
Minusstrang-Primer [100pmol/µl]	0,5µl
DNS-Template [50ng/µl]	1µl
DNS-Polymerase [2,5U/µl]	0,5µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem DNA Thermal Cycler 2400 von Perkin Elmer[®], wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah (Standardbeispiel):

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1 x	5min	95°C
Denaturierung	25-30 x	30s	95°C
„annealing“		30s	50-55°C (variabel)
„elongation“		1min/kb bzw. 2min/kb	72°C
„elongation“	1 x	10min	72°C

Für die Erfolgskontrolle wurde 1µl des Reaktionsansatzes auf ein DNS-Agarosegel aufgetragen (2.2.2.7).

2.2.2.11 Klonierung von PCR-Produkten

Enzyme: T4-DNS-Ligase, Fa. Fermentas
 Restriktionsendonukleasen, Fa. New England BioLabs, Fa. Takara
 Antarctic Phosphatase, Fa. New England BioLabs
 T4-Polynukleotidkinase, Fa. New England BioLabs
 Substanz: ATP [100mM]

Um PCR-Produkte in einen dephosphorylierten, linearisierten Vektor mit „sticky ends“ klonieren zu können, mussten diese vor dem Verdau mit kompatiblen Restriktionsenzymen zunächst mit Phenol/ Chloroform extrahiert und mit Ethanol und Isopropanol präzipitiert werden (2.2.2.4, 2.2.2.5). Die gereinigte DNS wurde je nach Menge in 30-50µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Standardansatz für den Verdau von PCR-Produkten:

27µl gereinigte DNS
 3µl 10 x Puffer
 je 10-15U Enzym

Der Verdau wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach auf ein Agarose-Gel aufgetragen (2.2.2.7). Das gewünschte DNS-Fragment wurde ausgeschnitten und über Ultrafree[®]-DA-Säulen gereinigt (2.2.2.8). Anschließend erfolgte die Ligation von Vektor-DNS und PCR-Fragment (2.2.2.9). PCR-Produkte, die mit Hilfe der *Pfu*-DNS-Polymerase amplifiziert wurden, verfügen sowohl am 3' als auch am 5' Ende über nicht phosphorylierte, glatte Enden („blund ends“). Um an ein glattes Ende im linearisierten, dephosphorylierten Vektor ligiert werden zu können, mussten diese zuvor mit der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Hierzu wurden der PCR-Reaktion (50µl) nach

Beendigung der Amplifikation 1µl ATP [100mM] und 5U T4-Polynukleotidkinase zugegeben und der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Reinigung und Ligation der PCR-Produkte erfolgte wie bereits beschrieben.

2.2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese („*Site-Directed Mutagenesis*“)

Enzyme: *Pfu*-DNS-Polymerase, Fa. Stratagene
 Dpn I, Fa. Stratagene

Reagenzien: 10 x *Pfu*-Puffer, Fa. Stratagene
 dNTPs [10mM], Fa. Boehringer Mannheim
 Plusstrang-Primer bzw. Minusstrang-Primer [100µM], Fa. Operon

Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer
 PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Die ortsgerichtete Mutagenese („*Site-Directed Mutagenesis*“) diente der Erzeugung einzelner Basenaustausche. Als Matrize wurde ein doppelsträngiges Plasmid verwendet, in das die Mutation eingefügt werden sollte. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschten Basenaustausche in ihrer Sequenz tragen und jeweils an den „*sense*“ und den „*antisense*“ Strang der DNS-Matrize binden. Aufgrund der „*proofreading*“ Aktivität wurde vorzugsweise die *Pfu*-DNS-Polymerase für ortsgerichtete Mutagenesen verwendet. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem DNA Thermal Cycler 2400 der Fa. Perkin Elmer oder in einem Mastercycler Gradient der Fa. Eppendorf. Die methylierte Ausgangs-DNS wurde durch Dpn I abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte, nicht methylierte DNS erhalten blieb. Die neu synthetisierte DNS ist wie die Ausgangs-DNS doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („*nicks*“) auf. Diese wurden durch die Ligation bei der Transformation in Bakterien „*repariert*“ (2.2.2.3).

Ein Standardansatz (50µl) für die ortsgerichtete Mutagenese wies folgende Zusammensetzung auf:

10 x PCR-Puffer	5µl
dNTPs [10mM]	1µl
Plusstrang-Primer [100pmol/µl]	0,5µl
Minusstrang-Primer [100pmol/µl]	0,5µl
DNS-Template [50ng/µl]	1µl
DNS-Polymerase [2,5U/µl]	0,5µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50µl

Die Programmierung der Zyklen sah folgendermaßen aus:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1 x	2min	94°C
Denaturierung	25-30 x	30s	94°C
„annealing“		45s	53-60°C (variabel)
„elongation“		2min/kb	72°C
„elongation“	1 x	5min	72°C

2.2.2.13 *In vitro* Transkription

Enzyme: *Sp6*-RNS-Polymerase, Fa. Takara
Sma I, Fa. New England BioLabs

Reagenzien: 10 x *Sp6*-Polymerase-Puffer, Fa. New England BioLabs
DTT [0,1M], Fa. Fermentas
„*Human Placenta Ribonuclease Inhibitor*“, Fa. Takara
rNTPs [10mM], Fa. Boehringer Mannheim
H₂O_{bidest}

Für die *in vitro* Transkription wurden 2,5µg Plasmid-DNS durch einen Restriktionsverdau (Sma I) linearisiert, anschließend über eine Phenol/ Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) gereinigt und mit Ethanol gefällt (2.2.2.5). Nachdem das getrocknete DNS-Pellet in 10µl H₂O_{bidest} (RNase frei) aufgenommen worden war, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

10 x <i>Sp6</i> -Polymerase-Puffer	1µl
DTT [0,1M]	1µl
DNS-Template [0,25µg/µl]	1µl
„ <i>Human Placenta Ribonuclease Inhibitor</i> “ [40U/µl]	1µl
rNTPs [10mM]	1µl
<i>Sp6</i> -RNS-Polymerase [50U/µl]	1µl
H ₂ O _{bidest}	4µl
Gesamtvolumen:	10µl

Die Transkription erfolgte für 1-2 Stunden bei 37°C. Danach wurde die Qualität der *in vitro* Transkripte über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die transkribierte RNS mit Ethanol gefällt (2.2.2.4).

2.2.2.14 Sequenzierung von DNS mittels „Cycle Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer

Reagenzien: „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“, Fa. Amersham

Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierte Oligonukleotide [2pmol/μl]

Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer

PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Für die Technik des „Cycle Sequencing“ wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“ von Amersham[®] verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde als PCR durchgeführt; da allerdings nur ein Oligonukleotid eingesetzt wurde, erfolgte keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation der DNS-Fragmente. Der Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem das Oligonukleotid markiert war, wurde bei der sich anschließenden Elektrophorese unterschiedlich großer DNS-Moleküle mittels Laser angeregt und detektiert. Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNS aus Mini- oder Midipräparationen verwendet.

Standardansatz für eine Sequenzierungsreaktion:

Plasmid-DNS	200ng/kb
IR 800-markierter Primer [2pmol/μl]	1μl
H ₂ O _{bidest}	ad 25μl

Die Sequenzierungsreaktion wurde anschließend auf vier PCR Reaktionsgefäße verteilt und jeweils 2μl der verschiedenen Didesoxynukleotidgemische des Kits dazugegeben. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1 x	2min	95°C
Denaturierung	30 x	15s	95°C
„annealing“		20s	50°C (variabel)
„elongation“		30s	70°C
„elongation“	1 x	5min	70°C

Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 4µl Stopp-Puffer beendet und auf 4°C gekühlt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Reaktionen zur Denaturierung für 2min auf 72°C erhitzt. Von den Reaktionsansätzen wurde jeweils 1,5µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

2.2.2.15 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Automatische Sequenzierung mit dem Sequenziergerät LICOR 4000 L:

Elektrophoresepuffer:

10 x „Long-Run“-Puffer:	162,0g	Tris
	27,5g	Borsäure
	9,3g	EDTA-Na ₂
	mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen	
„langes Gel“ (4%, 66cm):	32ml	SequaGel [®] XR Monomer Solution
	8ml	SequaGel [®] Complete Buffer
	2ml	„Long Run“-Puffer
	15ml	H ₂ O _{bidest}
	8g	Harnstoff
	400µl	10%-iges APS
	20µl	TEMED
„kurzes Gel“ (6%, 40cm):	30ml	SequaGel [®] XR Monomer Solution
	7,5ml	SequaGel [®] Complete Buffer
	300µl	10%-iges APS
	400µl	DMSO
Geräte:	Sequenzgelelektrophoreseapparaturen, Fa. LICOR	
	Sequenziergerät LICOR 4000 L, Fa. LICOR	

Für die Auftrennung der Proben wurden 0,2mm dicke Polyacrylamidgele verwendet. Die Länge der Gele war dabei von der Anzahl zu lesenden Basen abhängig: lange Gele (66 cm) wurden für die Auftrennung von bis zu 1000 Basen verwendet; kurze Gele (40cm) für etwa 700 Basen. Im Anschluss an den Lauf wurde das Gel verworfen, da die Detektion der Sequenz bei der automatischen Sequenzierung schon während des Laufs erfolgt. Die für die automatische Sequenzierung verwendeten Polyacrylamidlösungen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Gelsystems angesetzt.

Unmittelbar vor dem Gießen wurden TEMED und 10%-iges Ammoniumperoxidsulfat zu den Polyacrylamidlösungen gegeben.

Zur Herstellung der Gele wurden „Spacer“ zwischen die Glasplatten gelegt, die Platten in die dafür vorgesehenen Schienen eingespannt und auf eine entsprechende Apparatur gelegt, die ein horizontales Gießen des Gels ermöglichte. Nach etwa 20 Minuten war das Gel polymerisiert und konnte in das Sequenziergerät eingespannt werden. Um das Gel zu erwärmen, wurde zunächst ein Vorlauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

lange Gele	kurze Gele
(4%, 66cm)	(6%, 40cm)
2000V	1500V
37mA	37mA
45°C	50°C
50W	50W

Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 2min bei 72°C denaturiert. Der Gellauf wurde bei langen Gelen über Nacht, bei kurzen Gelen über 5-6 Stunden unter den gleichen Bedingungen wie für den Vorlauf durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNS-Banden erfolgte während des Laufs mittels eines computergesteuerten Lasers. Die als Bild- und Buchstabensequenz verfügbaren Daten wurden anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen (DNasis; DNA Strider) ausgewertet.

2.2.3 Klonierungen

2.2.3.1 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz	Länge, Restriktions- schnittstelle	+/-
JC 52	ATGTACCTCCAAAGAAATACGAGAGAAACC	30nt	+
JC 53	GGTTTCTCTCGTATTTCTTTGGAGGTACAT	30nt	-
JC 54	TTGGACTCTGCCCATTTCGATGCCAAACCC	29nt	+
JC 55	GGGTTTGGCATCGAATGGGCAGAGTCCAA	29nt	-
JC 74	CAGTGCGGTTACCATAAACTTCCCATCTTCG	31nt	-
JC 75	TGCGTGGTGAGTCGCAGATATCTCGCAATCTTGC	34nt	+

JC 77	GATGGGAAGTTTATGTACCTCGCACTGTGCGTGGTG	36nt	+
JC 78	CACCACGCACAGTGCAGAGGTACATAAACTTCCCATC	36nt	-
JC 79	TCTTTGGGTACCATAAACTTCCCATCTTCG	31nt	-
JC 80	GTAACCGCACTGTGCACGAGAAGTCGCAGATATCTCGC	38nt	+
JC 81	GCGAGATATCTGCGACTTCTCGTGCACAGTGCGGTTAC	38nt	-
JC 82	CACTGTGCGTGGTGGAACACAGATATCTCGCAATC	35nt	+
JC 83	GATTGCGAGATATCTGGTTTCCACCACGCACAGTG	35nt	+
JC 85	ACCAGGGAACTAGGTATCTAGCATCATTGCAC	33nt	+
JC 86	GTTTCGCTGCAGGTATTTAAAGGACCCTGCAGTGC	35nt	-
JC 91	CACTGTGCGTGGTGGAACGCAGATATCTCGCAATC	35nt	+
JC 92	GATTGCGAGATATCTGCGTTCCACCACGCACAGTG	35nt	-
JC 93	CACTGTGCGTGGTGAGTACCAGATATCTCGCAATC	35nt	+
JC 94	GATTGCGAGATATCTGGTACTCACCACGCACAGTG	35nt	-
JC 107	TATCACGACGCCATCTCTATTGCAAGAGGTACTGTC	36nt	-
JC 108	TCCACTGAAGGGGACATGAGTGCAAGATAGGAAAAGCAA C	40nt	+
JC 112	GGACATTAAAGTGCCTTATAGGAAACACAACGTACAG	38nt	+
JC 113	CTGTACAGTTGTGTTTCCTATAAGGCACTTTAATGTCC	38nt	-
JC 124	AGATATCTCGCATCGTTGCATAAGAGAGCCTTGCC	35nt	+
JC 125	GGCAAGGCTCTCTTATGCAACGATGCGAGATATCT	35nt	+
JC 126	CTAGATGAACGACTCGGGCCTATGCCTTGCAGACC	35nt	+
JC 127	AGCGTGCACTTTTACAGTTGTTTTTCCTATCTTGCAC	37nt	-
JC 130	TTGCAATAGAGAAGGCGTCGCGATATCCACTGAAGG	36nt	+
JC 131	CCTTCAGTGGATATCGCGACGCCTTCTCTATTGCAA	36nt	-
JC 132	TGGCGTCGTGATAGTACCACAAGGGGAACATGAGTGC	37nt	+
JC 133	GCACTCATGTTCCCCTTGTTGGTACTATCACGACGCCA	37nt	-
JC 134	TTAAAGTGCAAGATAGGAAAAACAACGTACAGG	34nt	+
JC 135	TGTCCCTTCAGTGGATATCACGACGCC	27nt	-
JC 138	CCGGCAATTGAGGAAATGAACGACAACCTTGAATTTGG	38nt	+
JC 139	ATTAGTCCCATCAAAGAGTTTTTTGAATACCACACTGG	38nt	-
JC 140	ACTACCTTACGCACAGAAGTGGTACGGACATATAGAAGG	39nt	+
JC 141	CGGTGATACTGCCGTACAGCTTACAGTCCCTGTCCATCC	39nt	-
JC 142	ATCGTAGAGAAGGAGGATCTCCATAACTGCATCCTTGG	38nt	+

JC 143	AGTGGTTACACAGTCTACCCTATGAGGGAATGGTTTAGAC	38nt	-
JC 144	CAACTGTAAAAGTGATAGCTATGGATGAACGACTCG	36nt	+
JC 145	CGAGTCGTTTCATCCATAGCTATCACTTTTACAGTTG	36nt	-
JC 146	GTGCACGCTCTAGATACAAAACCTCGGGCCTATGCC	35nt	+
JC 147	GGCATAGGCCCGAGTTTTGTATCTAGAGCGTGCAC	35nt	-
JC 149	GATACAAAGTTGGGCCCTATGCCGTGCAGACCC	33nt	+
JC 150	CATGGCGATCACCTGGACGGTAGTGTGCGCAATC	34nt	-
JC 151	CCCATTGGCAAGTGTATCTTGACGAACGAGACTGG	35nt	+
JC 152	CCAGTCTCGTTCGTCAAGATACACTTGCCAATGGG	35nt	-
JC 153	TACAGGGTGGTAGACAGTACCGATTGCAATAGAGAAGG	38nt	+
JC 154	CCTTCTCTATTGCAATCGGTACTGTCTACCACCCTGTA	38nt	-
JC 157	TGTCCCTTGTGGTACTATCACGACGCC	27nt	-
JC 158	AAGGCGTCGCGATAGTACCACAAGGGGAACATGAGTGC	38nt	+
JC 159	GCACTCATGTTCCCCTTGTGGTACTATCGCGACGCCTT	38nt	-
JC 162	GGAAAAACAACGTGTACAGGTGCACGCTCTAGATG	34nt	+
JC 163	CATCTAGAGCGTGCACCTGTACAGTTGTTTTTCC	34nt	-
JC 164	TAGAGATGGCGTCGCAATAGTACCACAAGG	30nt	+
JC 165	CCTTGTGGTACTATTGCGACGCCATCTCTA	30nt	-
JC 166	ACCACAAGGGGAACATAAATGCAAGATAGG	30nt	+
JC 167	CCTATCTTGCATTTATGTTCCCCTTGTGGT	30nt	-
JC 168	GAGCTACTCTTTGATGGGACTAATCCGGCAATTG	34nt	+
JC 169	GAATGTCACACTGGTCGGCAAGGCTCTTG	29nt	-
JC 170	GTAATCAAGGGGAAGTATAATACAACGCTGCTGAACGG	38nt	+
JC 171	GGGTGAAGTATCACATGGGCAGAGTCCAAATTC	33nt	-
JC 172	GAGTGTACGTCATTCAATATGGACACC	27nt	+
JC 173	TACAACCCCTGTCCATCCTATGGGGCATACC	31nt	-
JC 174	TGCAAGCTTGGAGGAAATTGGACTTGTGTG	28nt	+
JC 175	ATGGAAGAGATCCTCCCCCAGATTCTTTTGG	31nt	-
JC 176	CCTTACGGATTACCACACTACCCCATTTGGC	30nt	+
JC 178	TTTGGTTTTGGACTCTGCCCATGTGATGC	29nt	+
JC 179	ATCGTCATCCATTTGACTACATCCTCTTGC	33nt	-
JC 180	CCTGTTACTTACAAAGGGGGCTCTATTGAATCTTGC	36nt	+
JC 181	GTCTCCCTTCACACAAGTCCAATTTCTCCAAGG	34nt	-

JC 182	TACCTTGTATGCCCCATAGGATGGACAGGG	30nt	+
JC 183	GAAGGCGGATCCGTTTCAGCAGCGTTGTATTGAAC	34nt	-
JC 184	TTCAGAAGGGATAAACCATTCCCTCATAGGCAAGG	35nt	+
JC 185	TGTCTTTACCACTTCTGTGGCTAAGGTGTCC	31nt	-
JC 186	CAATGCCGGTGGTGTGGCTATCAATTTAAAGAG	33nt	+
JC 187	CTTTACTTGGCCCCCTTTGTATAGTAGTTGGTCTCC	36nt	-
JC 188	TAGAGATGGCGTCGCAATATCCACTGAAGG	30nt	+
JC 189	CCTTCAGTGGATATTGCGACGCCATCTCTA	30nt	-
JC 192	GGGACACTAAAATGCTTGATTGGCAACACTACCG	34nt	+
JC 193	CTGTGGGACAATTGCGACGCCATCTCTGTTGCAGTC	36nt	-
JC 194	TGCATTTTGGGGGGTAATTGGACATGTGTAAGGC	36nt	+
JC 195	GTTATGTAGGTCTTCTTTTCTACTATGGTGGTCAC	36nt	-
JC 196	CATTGCATCCTTGGAGGAAATTGGACTTGTG	31nt	+
JC 197	GAAGAGATCCTCCCCCAGATTCTTTGGGTG	31nt	-
JC 198	CTCCATAACTGCAAGCTTGGAGGAAATTGG	30nt	+
JC 199	CCAATTTCTCCAAGCTTGCAGTTATGGAG	30nt	-
JC 202	TGCAAGATAGGAAAAACAAGTGTACAGGTC	30nt	+
JC 208	GAGCTACTCTTTGATGGGCGAAAGCAAGAGGATGTAGTC G	40nt	+
GRS 1	CGTGTGATGATCCACCAAGATTTGTCTC	28nt	+
GRS 2	AAGCGGCCGCCTCCTGCACCTAAACCCTCAGCAC	34nt/ Not I	-
GRS 22	TTGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGG	35nt/ Eco RI	+
GRS 23	AATCTAGATCAATGATGATGATGATGATGGTCG	33nt/ Xba I	-

Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierte Oligonukleotide für die Sequenzierung:

T7pcDNA IR	TAATACGACTCACTATAGGG	20nt	+
sp6	GTATACGAGGTTAGCTCTTTCTCGTATA	28nt	-
M13	GTAAAACGACGGCCAGTG	18nt	+
M13rev	CAGGAAACAGCTATGACC	18nt	-

2.2.3.2 Klonierung der NADL/ Alfort E2-Chimären

2.2.3.2.1 Klonierung der E2-Chimären zur Charakterisierung des Einflusses der variablen Sequenzabschnitte im NADL E2 auf die CD46_{bov}-Bindung

Die Klonierung der NADL/ Alfort E2-Chimären erfolgte mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.2.12). Dabei wurden Nukleinsäureabschnitte im NADL E2, welche für drei bis zwölf Aminosäuren kodieren, gegen die analogen Kodons des Alfort E2 ausgetauscht. Als Ausgangskonstrukt („*Template*“) für die PCRs diente der Vektor pcDNA3 mit der Nukleinsäuresequenz des unveränderten NADL E2, der Transmembrandomäne sowie der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Hämagglutinin (pAH 43 (Himmelreich 2003)). Für die Insertion der Mutationen in das NADL E2 wurden die in Kapitel 2.2.3.1 aufgeführten, spezifischen Oligonukleotide („*Primer*“) verwendet. Aus der nachfolgenden Tabelle gehen die Namen der resultierenden NADL/ Alfort E2-Chimären sowie deren Plasmidnummern, die für die Klonierung verwendeten Primerpaare und die vorgenommenen Aminosäureaustausche hervor.

Name der NADL/ Alfort E2-Chimäre	Plasmid- nummer	Aminosäureaustausch NADL E2 -> Alfort E2	Primerpaar
NADL E2 (Alfort 55-63/C59)	pJC 123 ^{*)}	Y ₅₅ LQRCTRET ₆₃ -> VTALCVVSR	JC 74/ 75
NADL E2 (Alfort 68-71)	pJC 160	I ₆₈ lhT ₇₁ -> SlhK	JC 124/ 125
NADL E2 (Alfort 79-82)	pJC 212	V ₇₉ fKK ₈₂ -> TfEL	JC 169/ 208
NADL E2 (Alfort 87-92)	pJC 175	R ₈₇ KQEDVV ₉₂ -> TNPAIE	JC 138/ 139
NADL E2 (Alfort 79-92)	pJC 190 ^{**)*)}	V ₇₉ fKKlfdgRKQEDVV ₉₂ -> TfELlfdgTNPAIE	JC 168/ 169
NADL E2 (Alfort 96-100)	pJC 199	N ₉₆ dNfE ₁₀₀ -> DdDfG	JC 178/ 179
NADL E2 (Alfort 59)	pJC 109	C ₅₉ -> N	JC 52/ 53
NADL E2 (Alfort 59/104)	pJC 111 ^{**)*)}	C ₅₉ -> N und C ₁₀₄ -> F	JC 54/ 55
NADL E2 (Alfort 108-116)	pJC 195	A ₁₀₈ KpIVRgkF ₁₁₆ -> TSpVIKgkY	JC 170/ 171
NADL E2 (Alfort 124-127)	pJC 201	P ₁₂₄ afQM ₁₂₇ -> SafYL	JC 182/ 183
NADL E2 (Alfort 137-139)	pJC 196	T ₁₃₇ vS ₁₃₉ -> VvE	JC 172/ 173
NADL E2 (Alfort 142-150)	pJC 176	S ₁₄₂ FNMDtIA ₁₅₀ -> AVSPTtIR	JC 140/ 141

NADL E2 (Alfort 152-160)	pJC 202	T ₁₅₂ vVrT _{Yrr} S ₁₆₀ -> EvvKtFrrD	JC 184/ 185
NADL E2 (Alfort 166-175)	pJC 177	Q ₁₆₆ GcItQKNLG ₁₇₅ -> VDcVtTIVEK	JC 142/ 143
NADL E2 (Alfort 179-182)	pJC 197	H ₁₇₉ NcI ₁₈₂ -> FHcK	JC 174/ 175
NADL E2 (Alfort 191-196)	pJC 200	P ₁₉₁ gdQLL ₁₉₆ -> KgdPVT	JC 180/ 181
NADL E2 (Alfort 201-206)	pJC 203	S ₂₀₁ IEScK ₂₀₆ -> QVKQcR	JC 186/ 187
NADL E2 (Alfort 211-217)	pJC 198	Y ₂₁₁ QfkeSE ₂₁₇ -> FEfkePY	JC 176/ 179
NADL E2 (Alfort 227-229)	pJC 184	K ₂₂₇ lE ₂₂₉ -> IIT	JC 151/ 152
NADL E2 (Alfort 236-241)	pJC 185	L ₂₃₆ vdstS ₂₄₁ -> VvdstD	JC 153/ 154
NADL E2 (Alfort 245-256)	pJC 154	E ₂₄₅ gvAiVPQgTLK ₂₅₆ -> DgvViSTeGEHE	JC 107/ 108
NADL E2 (Alfort 258-261)	pJC 156	K ₂₅₈ igK ₂₆₁ -> LigN	JC 112/ 113
NADL E2 (Alfort 265-272)	pJC 161	Q ₂₆₅ vIaMdTK ₂₇₂ -> KvHaLdER	JC 126/ 127

zwischen NADL und Alfort E2 konservierte Aminosäuren sind klein geschrieben, die Großbuchstaben symbolisieren die variablen Aminosäuren

*¹) C₅₉ wurde beim Austausch des Sequenzabschnittes 59-63 gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 beibehalten

**¹) pJC 190 entstand auf Basis von pJC 175 und pJC 111 auf Basis von pJC 109

Im Anschluss an die PCR wurde die methylierte Ausgangs-DNS mit 20 Units Dpn I verdaut (2h bei 37°C) und transformiert (2.2.2.3)

2.2.3.2.2 Klonierung der E2-Chimären zur Charakterisierung der Aminosäureabschnitte Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂

Die Klonierung dieser E2-Chimären erfolgte ebenfalls mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.2.12). Die nachfolgende Tabelle zeigt die resultierenden NADL/ Alfort E2-Chimären, deren Plasmidnummer sowie das Ausgangs-Plasmid („Template“) und das Primerpaar, welche für die PCR verwendet wurden. Die kleinen Buchstaben stellen die zwischen NADL und Alfort E2 konservierten

Aminosäuren dar, während die unterstrichenen Großbuchstaben die ausgetauschten Aminosäuren symbolisieren:

Y₅₅LQRCTRET₆₃:

Name der NADL/ Alfort E2-Chimäre	Plasmid- nummer	„ <u>Template</u> “ und <u>Primer</u> paar
NADL E2 (Y ₅₅ <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> ₆₃)	pJC 126	T: pJC 123, P:JC 77/ 78
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>T</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> ₆₃)	pJC 106 * ^R	T: pJC 123; P:JC 75/ 79
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>R</u> ₆₃)	pJC 127	T: pJC 123; P:JC 80/ 81
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> ₆₃)	pJC 128	T: pJC 123; P:JC 82/ 83
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>R</u> ₆₃)	pJC 145	T: pJC 123; P:JC 91/ 92
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>T</u> ₆₃)	pJC 146	T: pJC 123; P: JC 93/ 94

H₁₇₉NcI₁₈₂:

NADL E2 (H ₁₇₉ Nc <u>K</u> ₁₈₂)	pJC 208 * ^R	T: pAH 43. P: JC 196/ 197
NADL E2 (<u>F</u> ₁₇₉ <u>H</u> <u>c</u> <u>I</u> ₁₈₂)	pJC 209	T: pAH 43 P: JC 198/ 199

E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆:

NADL E2 (E ₂₄₅ gvAi <u>S</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>g</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>E</u> ₂₅₆)	pJC 169	T: p JC154, P: JC 132/ 133
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gv <u>V</u> iVPQg <u>E</u> <u>H</u> <u>E</u> ₂₅₆)	pJC 170	T: p JC154, P: JC 134/ 135
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gv <u>V</u> i <u>S</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>g</u> TLK ₂₅₆)	pJC 171 * ^R	T: p JC154, P: JC 130/ 131
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gv <u>V</u> iVPQgTLK ₂₅₆)	pJC 188 * ^R	T: pJC 170, P: JC 134/ 157
NADL E2 (E ₂₄₅ gvAiVPQg <u>E</u> <u>H</u> <u>E</u> ₂₅₆)	pJC 189	T: pJC169, P: JC 158/ 159

NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAiVPQgTLK ₂₅₆)	pJC 193	T: pJC 188, P: JC 164/ 165
NADL E2 (E ₂₄₅ gvAiVPQg <u>E</u> HK ₂₅₆)	pJC 194	T: pJC 189, P: JC 166/ 167
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAiST <u>E</u> gTLK ₂₅₆)	pJC 204	T: pJC171, P: JC 188/ 189
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAiVPQgTLE ₂₅₆)	pJC 205 * ^R	T: pJC 193, P: JC 187/ 202

Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂:

NADL E2 (<u>K</u> ₂₆₅ vIaMd <u>E</u> R ₂₇₂)	pJC 178	T: pJC 161 P: JC 144/ 145
NADL E2 (<u>K</u> ₂₆₅ vHa <u>L</u> dTK ₂₇₂)	pJC 179	T: pJC 161 P: JC 146/ 147
NADL E2 (Q ₂₆₅ vHa <u>L</u> d <u>E</u> R ₂₇₂)	pJC 181	T: pJC 161 P: JC 162/ 163

Zwischen NADL und Alfort E2 konservierte Aminosäuren sind klein geschrieben, die unterstrichenen Großbuchstaben symbolisieren die ausgetauschten Aminosäuren des Alfort E2.

Die mit *^R gekennzeichneten Plasmide mussten nach dem Dpn I Verdau mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Hierzu wurde der PCR-Reaktion (50µl) 1µl ATP [100mM] und 5U T4-Polynukleotidkinase zugegeben und der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ethanolpräzipitation (2.2.2.5) wurde die DNS religiert und transformiert (2.2.2.3).

2.2.3.3 Klonierung der Alfort/ NADL E2-Chimären

Die Nukleinsäuresequenzen, die für die vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ des NADL E2 kodieren, wurden stufenweise mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.2.12) in das KSPV E2 eingefügt. Im Anschluss an den Dpn I Verdau wurde die DNS mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert (2.2.3.2.2), religiert und transformiert (2.2.2.3).

Name der Alfort/ NADL E2-Chimäre	Aminosäureaustausch Alfort E2 -> NADL E2	Plasmid- nummer	„Template“ und Primerpaar
Alfort E2 (NADL I)	V ₅₅ TALN <u>V</u> VSR ₆₃ -> YLQRN <u>T</u> RET	pJC 131 ^{*)}	T: pHL 2288, P:JC 85/ 86
Alfort E2 (NADL I + III)	F ₁₇₈ HcK ₁₈₁ -> HNcI	pJC 180	T: pJC 131; P:JC 149/ 150
Alfort E2 (NADL I + III +IV)	D ₁₄₄ gvViSTeGEHE ₂₅₅ - > EgvAiVPQgTLK	pJC 206	T: pJC 180; P:JC 192/ 193
Alfort E2 (NADL I + II +III +IV)	K ₂₆₄ vHaLdER ₂₇₁ -> QvIaMdTK	pJC 207	T: pJC 206; P:JC 194/ 195

Zwischen NADL und Alfort E2 konservierte Aminosäuren sind klein geschrieben, die Großbuchstaben symbolisieren die variablen Aminosäuren.

^{*)} N₅₉ wurde beim Austausch des Sequenzabschnittes 59-63 im Alfort E2 gegen die analogen Aminosäuren des NADL E2 beibehalten

2.2.3.4 Etablierung eines Fusionsplasids aus bovinem CD46 (CD46_{bov}) und humanem Fc-Fragment (Fc_{hum})

Plasmide: p583 (pTre mit bovinem CD46), (Himmelreich 2003)

Fc-Plasmid (Birkmann et al., 2001)

Primer: GRS 1, GRS 2 (enthält Not I site)

Enzyme: Restriktionsenzyme (Not I, Sfi I), Fa. Takara, Fa. New England BioLabs

T4-DNS-Polymerase, Fa. Takara

T4-Polynukleotidkinase, Fa. New England BioLabs

T4-DNS-Ligase, Fa. Fermentas

Antarctic Phosphatase, Fa. New England BioLabs

Reagenzien: dNTPs [10mM]

ATP [100mM]

Aus dem Plasmid p583 wurde die für die vier „*Complement Control Proteins*“ kodierende Nukleinsäuresequenz des CD46_{bov} mittels der *Pfu*-DNS-Polymerase und den Oligonukleotiden GRS 1 und GRS 2 amplifiziert (2.2.2.10). Anschließend erfolgte die Reinigung des PCR-Produktes über eine Phenol/ Chloroform Extraktion (2.2.2.4) sowie eine Isopropanolpräzipitation (2.2.2.5). Die DNS

wurde in 50µl H₂O_{bidest} aufgenommen, wovon die Hälfte mit Not I verdaut wurde (2h bei 37°C). Um die Ligation mit dem Vektor zu ermöglichen, musste die Schnittstelle phosphoryliert werden. Dazu wurden zum Verdau 1µl ATP [100mM] und 5U T4-Polynukleotidkinase gegeben und der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurde das Vektorplasmid (Fc-Plasmid) linearisiert. Zunächst wurde es mit dem Restriktionsenzym Sfi I für eine Stunde bei 50°C verdaut. Um ein glattes Ende zu generieren wurden dem Verdau 5µl dNTPs [10mM] und 5U der T4-DNS-Polymerase zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 20min. Das linearisierte Vektorplasmid wurde im Anschluss an die Phenol/ Chloroform Extraktion (2.2.2.4) und Isopropanolpräzipitation (2.2.2.5) mit Not I verdaut (1h bei 37°C) und mit der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Sowohl das Vektorplasmid als auch das PCR-Produkt wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und über Ultrafree[®]-DA-Säulen aufgereinigt (2.2.2.8), bevor sie ligiert (2.2.2.9) und transformiert (2.2.2.3) werden konnten. Das entstandene Plasmid wurde pJC 107 genannt.

2.2.3.5 Klonierung eines pTre Plasmids mit bovinem CD46 und humanem Fc-Fragment zur Herstellung von Tet on Zelllinien

Plasmide:	pJC 107 (Fc-Plasmid mit Nukleinsäuresequenz der CCPs des bovinem CD46) pGEM T, Fa Promega pTre, Fa Clontech
Primer:	GRS 22 (enthält Eco RI site) und GRS 23 (enthält Xba I site)
Enzyme:	Restriktionsenzyme (Eco RI, Xba I), Fa. Takara, Fa. New England BioLabs T4-DNS-Polymerase, Fa. Takara T4-Polynukleotidkinase, Fa. New England BioLabs T4-DNS-Ligase, Fa. Fermentas Antarctic Phosphatase, Fa. New England BioLabs
Reagenzien:	dNTPs [10mM] ATP [100mM]

Um eine regulierbare Expression von CD46_{bov}-Fc_{hum} in eukaryotischen Zellen zu ermöglichen, musste die für das Fusionsprotein kodierende Nukleinsäuresequenz in das Vektorplasmid pTre kloniert werden. Zunächst wurde die für CD46_{bov}-Fc_{hum} kodierende Nukleinsäuresequenz ausgehend von pJC 107 mittels PCR unter Verwendung der *Pfu*-DNS-Polymerase und der Oligonukleotide GRS 22 und 23 amplifiziert. Das gewonnene PCR-Produkt wurde gereinigt und in den pGEM-T Vektor kloniert (pGRS 22). Dies erlaubte eine Sequenzanalyse der DNS mit Hilfe der IR-markierten Oligonukleotide

M13 und M13rev (2.2.2.14). Der pGEM-T Vektor verfügt über einen Thymin-Überhang, so dass PCR-Produkte, die durch die *Pfu*-DNS-Polymerase synthetisiert wurden, vor der Ligation modifiziert werden mussten. Dazu wurde das A-Addition Kit von Qiagen verwendet, das am 3'- und 5'- Ende Adenin-Überhänge generiert und somit die Insertion des „*blund ended*“ PCR-Produktes in den pGEM-T Vektor ermöglicht. Die DNS wurde entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt. Aus pGRS 22 wurde die für CD46_{bov}-Fc_{hum} kodierende Nukleinsäuresequenz über einen Restriktionsverdau mit Eco RI und Xba I herausgeschnitten und das mit Eco RI geschnittene Ende „*blund*“ gemacht. Das Vektorplasmid pTre wurde vor der Ligation auf dieselbe Weise vorbereitet und dephosphoryliert. Für die Herstellung eines glatten („*blund*“) Endes wurden dem Verdau 5µl dNTPs [10mM] und 5U der T4-DNS-Polymerase zugegeben. Des Weiteren erfolgte eine Phosphorylierung dieses Endes unter Verwendung von 1µl ATP [100mM] und 5U T4-Polynukleotidkinase. Das resultierende Plasmid wurde pGRS 27 genannt.

2.2.3.6 Kolokalisierung von CD46_{bov}-Fc_{hum} mit NADL und Alfort E2

Zellen:	BHK
Plasmide:	pAH 43 (pcDNA3 mit NADL E2, Influenza HA-tail (Himmelreich 2003)) pHL 2288 (pcDNA3 mit Alfort E2, Influenza HA-tail (Zhou et al., 1998))
Antikörper:	Primärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20) mAk 65A (1:5) Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA) Ziege-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert, Fa. Dianova Ziege-anti-Human IgG, Cy3-konjugiert, Fa. Dianova
Medium:	Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika
Lösungen:	Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS PBS defiz. PBS + 0,01% Tween 20 Einbettungsmedium
Materialien:	Glasdeckgläschen rund, Ø 12mm, Fa. MAGV
Gerät:	Mikroskop DMI 6000 CS Trino, Fa. Leica
Verarbeitungssoftware:	TCS SP-5, Fa. Leica

BHK-Zellen wurden 24 Stunden vor der Infektion mit MVAT7 und der Transfektion mit den für NADL und Alfort E2 kodierenden Plasmiden (2.2.1.4) auf Deckgläschen ausgesät. Etwa fünf Stunden

nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika gewaschen und mit jeweils 5µg gereinigtem CD46_{bov}-Fc_{hum} in einem Volumen von 200µl inkubiert (1h bei RT). Die Zellen wurden erneut für 3 x fünf Minuten mit Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika gewaschen, bevor sie mit 4%-igem PFA fixiert wurden (20min/ 4°C). Nach einem Waschschrift mit PBS defiz. wurden zunächst die E2 Proteine markiert. Dazu wurden die Zellen mit dem mAk 65A (1:5) und dem Alexa 488-markierten (grün fluoreszierend) anti-Maus Antikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Nachweis von gebundenem CD46_{bov}-Fc_{hum} mit Hilfe des Alexa 555-markiertem (rot fluoreszierend) anti-Human Antikörpers. Jede Inkubation wurde in einem Volumen von 200µl bei 37°C für 1 Stunde durchgeführt, gefolgt von jeweils drei Waschschriften (2 x 1min, 1 x 5min) mit PBS + 0,01% Tween 20. Als Kontrolle wurden E2-exprimierende Zellen mitgeführt, die nicht mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert wurden. Auf diese Weise konnte eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper ausgeschlossen werden. Zum Schluss wurden die Deckgläschen abgetupft und umgedreht auf einen Tropfen Einbettungsmedium (2.2.3.6.1) gelegt. Der Rand wurde mit Nagellack versiegelt und die Präparate mittels eines umkehrten Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

2.2.3.6.1 Einbettungsmedium (Mowiol)

Mowiol:	6g	Glyzerin
	2,4g	Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol), Fa. Sigma
lösen in:	6ml	H ₂ O _{bidest}
	12ml	0,2M Tris pH 8,5
zentrifugieren bei 5000 x g 15min		
pro ml angesetztes Mowiol zugeben:		
	0,1g	1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octan (DABCO), Fa. Fluka

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Zellyse

Lysepuffer:	1% Triton X-100 (w/v) in 50mM Tris-HCl pH 8,0
Lösung:	PBS defiz.
Gerät:	Tischzentrifuge: 5415C, Fa. Eppendorf

Alle Schritte der Zelllyse fanden bei 0°C statt. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS defiz. gewaschen und anschließend mit Lysepuffer für 10min inkubiert. Während die Zellwände aufgebrochen werden, bleiben die Zellkerne intakt, so dass das Lysat nicht durch Nukleinsäuren kontaminiert wird. Die Zellkerne wurden vor der weiteren Verwendung der Lysate durch Zentrifugation (10000 x g, 5min) abgetrennt.

2.2.4.2 SDS-PAGE mit Tris-Tricin-Puffer

Lösungen für das Gelsystem:

3 x Gelpuffer:	0,3M	Tris-HCl pH 8,45
	0,3%	SDS
10 x Anodenpuffer:	0,2M	Tris-HCl pH 8,9
10 x Kathodenpuffer:	0,1M	Tris-HCl pH 8,25
	0,1M	Tricin
	1%	SDS (w/v)
Probenpuffer:	6M	Harnstoff
	62,5mM	Tris-HCl pH 6,8
	2%	SDS
	10%	Glyzerol (v/v)
	0,025%	Bromophenolblau (w/v)
	0,025%	Phenolrot (w/v)
Molekulargewichtsstandard:	„ <i>prestained protein marker</i> “, Fa. Invitrogen	
Acrylamidlösung (30:1):	40%	Acrylamid (w/v), Fa. Applichem
Glyzerin:	87%	Stammlösung (v/v)
TEMED:	>99%	Stammlösung (v/v)
Ammoniumperoxidsulfat:	10mg/ml	in H ₂ O _{bidest} (Stammlösung), jeweils frisch angesetzt, Fa. Alexis Biochemicals
Geräte:	Proteinelektrophoresekammern, Werkstatt des MZI, JLU Gießen; Gelgröße: 6 x 8cm; Spacer 0,75µm	

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das SDS-PAGE System mit Tris-Tricin-Puffer verwendet (Trenngel, Acrylamid-Endkonzentration 7,5%; Sammelgel, Acrylamid-Endkonzentration 4%). Die Elektrophoresen wurden mit einer vertikalen Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Handelte es sich beim Probenmaterial um gereinigte Proteine, wurden diese vor dem

Auftragen in jeweils gleichem Volumen an Probenpuffer aufgenommen und 5min bei 95°C erhitzt. Hingegen wurden Zelllysate (2.2.4.1) meist ohne weitere Verdünnung mit Probenpuffer aufgeköcht. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 60V im Sammelgel und bei 120V im Trenngel. Das Trenngel wurde nach Beendigung der Elektrophorese entweder für die Immunoblot-Analyse (2.2.4.3) oder die Coomassie-Färbung (2.2.4.4.1) weiterverwendet.

2.2.4.3 Immunoblot Analyse von Proteinen (Western Blot)

Antikörper:	Primärantikörper:	mAk (65A, A18, BVD/ Ca 17, 26, 27 (je1:5), siehe 2.1.4
	Sekundärantikörper:	
		Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus (1:10000)
		Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Human IgG (1:4000)
Lösungen:	Transferpuffer:	10 x Puffer (480mM Tris-HCl, 390mM Glycin in H ₂ O _{bidest} gelöst)
	Blockierlösungen:	4% Magermilchpulver (Fa. Frema) in PBS + 0,01% Tween 20 Rotiblock® (1:10 in H ₂ O _{bidest}), Fa. Roth
	Waschpuffer:	PBS + 0,01% Tween 20
Material:	Nitrozellulosemembran:	„pure nitrocellulose“, Fa. Pall
	Filme:	BioMax, BioMax light, Fa. Kodak
Geräte:	Nass-Blot-Apparatur,	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
	Mini Protean,	Fa. BioRad
	Horizontaler Schüttler,	Fa. Edmund Bühler
Reagenzien:	Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN TM),	Fa. Pierce
	Ponceau Rot,	Fa. Roth

Mittels dieser Methode konnten Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE (2.2.4.2) nachgewiesen werden. Zunächst wurde das Sammelgel verworfen und die im Trenngel aufgetrennten Proteine unter Verwendung einer Transfer Apparatur mit 14V für 1h auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Um eine Überhitzung des Gels zu vermeiden, wurde der Proteintransfer auf Eis durchgeführt. Dann wurde die Membran mit Ponceau Rot gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Außerdem konnte man auf diese Weise Spuren einer Nitrozellulosemembran, die mit unterschiedlichen Antikörpern detektiert werden mussten, markieren und ausschneiden. Zunächst wurde die Membran 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Blockierlösung fand meistens 4% Magermilchpulver in PBS + 0,01% Tween 20 Verwendung. Die Blockierung mit Rotiblock® war nur beim CD46_{bov}-Nachweis

nötig. Als nächstes erfolgten bei Raumtemperatur die jeweils einstündigen Inkubationen mit dem ersten und zweiten Antikörper. Nach den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Membranen jedoch immer 3 x 10min mit PBS + 0,01 % Tween 20 gewaschen. Während die Waschschrte und die Antikörperzugabe manuell durchgeführt wurden, fanden die Inkubationsschritte auf einem Schüttler statt. Schließlich wurden für eine Minute 0,5ml „*Oxidizing Reagent*“ und 0,5ml „*Enhanced Luminol Reagent*“ des Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NENTM) auf die Membran gegeben. Auf BioMax oder BioMax light Filmen konnten die Proteine anschließend mittels Autoluminographie (ca. 10s, 60s oder länger) sichtbar gemacht werden.

2.2.4.4 Proteinfärbung:

2.2.4.4.1 Coomassie-Färbung

Lösungen:

Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassieblau, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol in H₂O_{bidest} und filtriert

Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in H₂O_{bidest}

Material: Zellophanfolie, Fa. Roth

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele zunächst für 1h mit Färbelösung inkubiert und anschließend mehrmals mit Entfärbelösung gewaschen. Schließlich erfolgte die Trocknung des Gels zwischen zwei Zellophanblättern.

2.2.4.4.2 Silberfärbung von Proteinen

Fixierlösung: 50% Ethanol (v/v), 12% Essigsäure(v/v), 0,0185% Formaldehydlösung (v/v) in H₂O

Imprägnierlösung: 0,2% AgNO₃ (w/v), 0,028% Formaldehydlösung (v/v) in H₂O_{bidest}

Entwicklerlösung: 6% Na₂CO₃ (w/v), 0,0185% Formaldehydlösung (v/v), 2% der Fixierlösung in H₂O_{bidest}

Waschlösungen: 30% Ethanol (v/v) in H₂O_{bidest}
50M Methanol (v/v) in H₂O_{bidest}

Material: Zellophanblätter, Fa. Roth

Mit Hilfe der Silberfärbung wurde der Reinheitsgrad von gereinigtem CD46_{bov}-Fc_{hum} bestimmt. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei 1-10ng Protein/ Bande.

Zuerst wurden 10µl des gereinigten Proteins im gleichen Volumen Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C 5min aufgeköcht. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das SDS-PAGE System mit Tris-Tricin-Puffer verwendet (Trenngel, Acrylamid-Endkonzentration 7,5%; Sammelgel, Acrylamid-Endkonzentration 4%). Die Elektrophorese fand bei 100V statt. Die anschließende Silberfärbung wurde bei Raumtemperatur in den folgenden Schritten durchgeführt:

1. Schritt: Fixieren mit Fixierlösung (1h)
2. Schritt: Waschen mit 30% Ethanol (3 x 20min)
3. Schritt: Vorbehandeln des Gels (1min) mit 0,2g Na₂S₂O₃ 5 x H₂O/1 H₂O_{bidest}
4. Schritt: Waschen mit H₂O_{bidest} (3 x 20s)
5. Schritt: Imprägnieren des Gels mit Imprägnierlösung (20min)
6. Schritt: Waschen mit H₂O_{bidest} (2 x 20s)
7. Schritt: Entwickeln mit Entwicklerlösung (je nach Intensität der Färbung zwischen 3- 10min)
8. Schritt: Waschen mit H₂O_{bidest} (2 x 2min)
9. Schritt: Abstoppen der Reaktion mit der Fixierlösung (10min)
- 10 Schritt: Waschen mit 50M Methanol (v/v) (20min)

Schließlich wurde das Gel zwischen zwei Zellophanblättern getrocknet.

2.2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration („BC-Mikroassay“)

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde das „BCATM Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hierbei erfolgt die Ermittlung der Proteinkonzentrationen anhand einer BSA Standardkurve. Dazu wurde BSA (2mg/ml Stammlösung, Fa. Pierce) in Konzentrationen von 25µg/ml bis 1500µg/ml in PBS verwendet und die zu messende Probe mit PBS 1:5 bzw. 1:10 verdünnt. Je 25µl der verdünnten Probe und des BSA wurden mit 200µl der „BCATM working reagent“ gemischt. Diese setzte sich aus Reagenz A und B zusammen, die zuvor im Verhältnis 50:1 gemischt wurde. Nach einer Inkubation von 30min bei 37°C wurden die Proben zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend konnte die Extinktion zwischen 540 und 590nm photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.2.4.6 Nachweis von löslichen Proteinen (NADL E2, CD46_{bov}-Fc_{hum}) im ELISA

Proteine:	gereinigtes, lösliches NADL E2 (bereitgestellt von T. Krey) gereinigtes, lösliches CD46 _{bov} -Fc _{hum}
Antikörper:	mAk BVD/ Ca 17, 26, 27 (gereinigt, Überstand), mAk 65A Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA): Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG (1:8000)
Lösungen:	TBS + 0,05% Tween 20 TBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA TMB-Substrat: 9ml TMB-Puffer (100mM Na-Acetat pH 5,2) 1ml TMB-Substrat-Stock (10mg TMB (Tetramethylbenzidine, Fa. Applichem) in 4ml DMSO) 1,5µl H ₂ O ₂ (30%) Stopplösung: H ₂ SO ₄ konz. 1:4 verdünnt in H ₂ O _{bidest}
Gerät:	ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT
Verbrauchsmaterialien:	ELISA-Platten, Fa. Nunc

Zunächst wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit 200ng gereinigtem, löslichem NADL E2 oder CD46_{bov}-Fc_{hum} bzw. mit TBS beschichtet (über Nacht bei 4°C). Danach wurde die Blockierlösung bestehend aus 1% BSA in TBS + 0,05% Tween 20 zugegeben (1h bei 37°C), um eine unspezifische Bindung der Primär bzw. Sekundärantikörper zu verhindern. Zum Nachweis des NADL E2 wurde 65A-haltiger Hybridomüberstand (1:20) verwendet. Das Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde sowohl mit 500ng gereinigtem BVD/ Ca 17 oder 26 als auch mit unverdünntem Hybridomüberstand bestehend aus gleichen Teilen an BVD/ Ca 17, 26 und 27 nachgewiesen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde der 1:8000 verdünnte Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Maus Antikörper zugegeben und die Platte erneut eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zwischen jedem der Inkubationsschritte wurde die Platte jeweils drei Mal unter kräftigem Schütteln mit TBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend gut ausgeklopft. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 100µl/ „well“. Zum Schluss wurde das TMB-Substrat auf die Platte gegeben. Die Reaktion von Substrat und Meerrettich-Peroxidase wurde beim E2-Nachweis nach einer Minute, beim CD46_{bov}-Fc_{hum}-Nachweis nach drei Minuten mit H₂SO₄ (1:4) abgestoppt. Die anschließende Auswertung des ELISAs erfolgte mit Hilfe des ELISA Readers. Jedes Experiment wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

2.2.5 Generierung und Reinigung des Fusionsproteins aus löslichem, bovinem CD46 und humanem Fc-Fragment

2.2.5.1 Etablierung induzierbarer, CD46_{bov}-Fc_{hum}-exprimierender BHK Tet on Zelllinien

Zellen:	BHK Tet on
Medien:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika + 100µg/ml G418 Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika + 100µg/ml G418 + 5µg/ml Puromycin
Lösung:	Trypsin
Verbrauchsmaterialien:	6 „well“ Gewebekulturschale 48 „well“ Gewebekulturschale Filterpapier, Fa. Whatman

Als Grundlage für die Herstellung der Zelllinie wurden BHK Tet on Zellen verwendet, die stabil mit dem Regulatorplasmid pEF Tet on Neo transfiziert worden sind. Dieses Plasmid vermittelt eine Geneticin (G418) Resistenz und kodiert unter der Kontrolle eines EF-Promotors für den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transkriptions-Aktivator (rtTA) (Harada et al., 2000). In Anwesenheit von Tetrazyklin bzw. dessen Analog Doxizylin kann der rtTA an eine bestimmte DNS-Sequenz binden, den so genannten Tet-Operator. Die Tet-Operator Sequenz befindet sich im Antwortplasmid pTre, welches die für das CD46_{bov}-Fc_{hum} kodierende Sequenz enthält (pGRS 27, 2.2.3.5). Um deren Integration in die chromosomale DNS zu erleichtern, wurde das Antwortplasmid zuvor mit Fsp I linearisiert. Da das pTre-Plasmid für keine Resistenz kodiert, wurde als Selektionsmarker das mit Hind III linearisierte Plasmid pcEF Pac kotransfiziert (Rinck et al., 2001). Dieses ermöglichte die spätere Selektion stabil transfizierter Zellen unter Verwendung von Puromycin.

BHK Tet on Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in 6 „well“ Gewebekulturschalen ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollte die Konfluenz etwa 60-80% betragen. Die Zellen wurden mit den beiden linearisierten, gereinigten Plasmiden pGRS 27 (2,5µg) und pcEF Pac (0,5 µg) unter Verwendung von Superfect[®] kotransfiziert (2.2.1.4). Nach 48 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und in FKS-haltigem Medium mit 100µg/ml G418 und 5µg/ml Puromycin aufgenommen. Diese Zellen wurden in Verdünnungsstufen von 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 in Ø 10cm Gewebekulturschalen ausgesät und solange im Brutschrank kultiviert bis resistente Einzelklone gewachsen waren. Mit Hilfe von in Trypsinlösung getränkten Filterpapierstückchen konnten diese

Klone isoliert und in 24 „well“ Gewebekulturschalen überführt werden. Nach 24 Stunden wurden die Filterpapierstückchen entfernt und das Selektionsmedium gewechselt. Als sich die Zellklone zu einem konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurden sie zum Nachweis der CD46_{bov}-Expression für 24h mit und ohne Zusatz von 5µg/ml Doxizykin im Zellkulturmedium inkubiert. Zehn Mikroliter des Zellkulturüberstandes wurden in der Western Blot Analyse (2.2.4.1) auf das Vorkommen von löslichem CD46_{bov}-Fc_{hum} getestet. Im Anschluss daran wurden die Zellen für die indirekte Immunperoxidase mit PFA (4%) fixiert (2.2.1.7.1) oder für die Western Blot Analyse lysiert (2.2.4.1).

2.2.5.2 Gewinnung von CD46_{bov}-Fc_{hum}-haltigen Überständen

Zellen:	BHK Tet on GRS 27
Medium:	Dulbecco's MEM mit 10% FKS und Antibiotika + 100µg/ml G418
Lösung:	Trypsin
Reagenz:	Doxizykin, Fa. ICN
Verbrauchsmaterialien:	Ø 15cm Zellkulturschalen

Für die Herstellung ausreichender Mengen des löslichen Proteins CD46_{bov}-Fc_{hum} wurden die BHK Tet on Zellen (BHK Tet on GRS 27; 2.2.5.1) auf Ø 15cm Zellkulturschalen ausgesät und mit 5µg/ml Doxizykin induziert. Nach 48h wurde der Überstand abgenommen und die Zellen so ausgesät, dass eine Konfluenz von etwa 40% vorlag, bevor sie erneut mit Doxizykin-haltigem Medium für weitere 48h bei 37°C inkubiert wurden. Die Überstände wurden gesammelt und zunächst bei -25°C gelagert.

2.2.5.3 Reinigung des Fusionsproteins CD46_{bov}-Fc_{hum}

Lösungen:	Puffer A (1M Tris-HCl, pH 8,0)
	Puffer B (100mM Tris-HCl, pH 8,0)
	Puffer C (10mM Tris-HCl, pH 8,0)
	„Gentle Ag/ Ab Elution Buffer, pH6,6“, Fa. Pierce
	TBS pH 8,0
	TBS + 0,05% Tween 20
	TBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA
	TMB-Substrat (2.2.1.7.2)
	Stopplösung: H ₂ SO ₄ konz. 1:4 verdünnt in H ₂ O _{bidest}
Antikörper:	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Human IgG (1:4000)

Materialien: Sterilfilter 0,45µm, Fa. Millipore
Hi Trap 1ml Protein A Säule, Fa. Amersham
Dialyseschlauch 7,000 MWCO, Fa. Pierce
ELISA-Platte, Fa. Nunc

Geräte: Pumpe: Varioperpex[®] II Pump, Fa. LKB Bromma
ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT

Das Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde affinitätschromatographisch über Protein A Sepharose gereinigt. Dieses Protein bindet besonders stark an das Fc-Fragment humaner Immunglobuline. Ein Liter des CD46_{bov}-Fc_{hum}-haltigen Überstandes wurde zunächst filtriert, um Zelldebris zu entfernen, der zur Verstopfung der Säule führen kann. Dazu verwendete man einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45µm. Nach Zugabe von Puffer A (Endkonzentration 100mM) wurde eine 1ml Hi Trap Chromatographiesäule mit dem Filtrat beladen und an eine Pumpe angeschlossen. Zuvor erfolgte jedoch die Äquilibration der Chromatographiesäule mit Puffer B. Die Reinigung fand bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1ml/min bei 4°C statt. Anschließend wurde die Säule zweimal hintereinander gewaschen, zuerst mit 10ml Puffer B und danach mit 10ml Puffer C. Das an die Säule gebundene Protein wurde anstatt durch Ansäuerung des pH Wertes mit dem „*Gentle Ag/ Ab Elution Buffer, pH 6,6*“ eluiert. Dadurch sollte eine eventuell auftretende Konformationsänderung des CD46_{bov}-Fc_{hum} verhindert werden, die die Bindungsaktivität von CD46_{bov} beeinträchtigen könnte. Es wurden zwölf Fraktionen von 0,5ml gewonnen, die im ELISA jeweils im Duplikat auf das Vorhandensein von CD46_{bov}-Fc_{hum} getestet wurden. Hierfür wurden zunächst ELISA-Platten mit 10µl jeder Fraktion in einem Gesamtvolumen von 100µl beschichtet (1h bei 37°C). Die Platten wurden dreimal mit TBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend mit TBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA blockiert (1h bei 37°C). Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte der Nachweis des CD46_{bov}-Fc_{hum} mit dem anti-Human-PO Antikörper (1:4000). Die Platten wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert, bevor sie erneut dreimal gewaschen wurden. Schließlich wurde das Substrat zugegeben und dessen Reaktion mit der Peroxidase nach fünf Minuten abgestoppt. Die OD-Werte konnten mit dem ELISA Reader gemessen werden. Alle Fraktionen, die eine OD von 0,3 oder höher aufwiesen, wurden gepoolt und über Nacht bei 4°C gegen das 200-300fache Volumen TBS (pH 8,0) dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines „*BC-Mikroassays*“ bestimmt (2.2.4.5).

2.2.6 Etablierung eines Zell-ELISAs zur Quantifizierung der E2-CD46_{bov}-Bindung

Zellen:	BHK
Protein:	gereinigtes, lösliches CD46 _{bov} -Fc _{hum}
Antikörper:	Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA): Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Human IgG (1:8000)
Medium:	Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika
Lösungen:	PBS defiz. PBS + 0,01% Tween 20 + 2% BSA Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS TMB-Substrat: 9ml TMB-Puffer (100mM Na-Acetat pH 5,2) 1ml TMB-Substrat-Stock (10mg TMB (Tetramethylbenzidine, Fa. Applichem) in 4ml DMSO) 1,5µl H ₂ O ₂ (30%) Stopplösung: H ₂ SO ₄ konz. 1:4 verdünnt in H ₂ O _{bidest}
Geräte:	ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT Mehrkanalpipette, Fa. Biohit
Verbrauchsmaterialien:	Mikrotiterplatten, Fa. Nunc

Sechzehn Stunden vor der Infektion mit Vaccinia Virus MVAT7 wurden $5,4 \times 10^4$ BHK-Zellen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte ausgesät, damit zum Zeitpunkt der Transfektion ein konfluenter Zellrasen vorlag. Fünf Stunden nach der Transfektion der Zellen (2.2.1.4) mit den zu testenden Plasmiden wurden die Zellen zunächst 3 x 5min mit Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika gewaschen. Dann wurden diese mit 5µg CD46_{bov}-Fc_{hum} und Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika in einem Gesamtvolumen von 100µl für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Vorfeld wurde der Zell-ELISA auch mit Mengen von 0,5; 1 und 10µg CD46_{bov}-Fc_{hum} durchgeführt. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass die mindestens einzusetzende Menge an CD46_{bov}-Fc_{hum} bei 5µg liegt. Bei dieser Menge konnten für NADL E2-exprimierende Zellen (Positivkontrolle) OD-Werte gemessen werden, die sich von den OD-Werten der Alfort E2-exprimierenden Zellen bzw. den nicht transfizierten BHK-Zellen (Negativkontrollen) am stärksten unterschieden. Als nächstes wurden die Zellen erneut mit angewärmtem Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika gewaschen. Dieser Schritt stellte eine besondere Schwierigkeit dar, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht fixiert

waren und sich sehr leicht von der Platte ablösen. Mit Hilfe ausgedehnter Waschschriffe (3 x 5min ohne Schütteln) war es dennoch möglich, unspezifisch hängen gebliebenes CD46_{bov}-Fc_{hum} weitestgehend zu entfernen, ohne die Zellen dabei abzulösen. Im Anschluss daran wurden die BHK-Zellen mit PFA (4%) 20min bei 4°C fixiert und einmal mit PBS defiz. gewaschen. Zum Nachweis von gebundenem CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde der Ziege-anti-Human-PO Antikörper verwendet, welcher 1:8000 in PBS + 0,01% Tween 20 verdünnt worden war. Mit dieser Konzentration des Sekundärantikörpers konnte der Hintergrund reduziert werden. Gleichzeitig war die Signalstärke jedoch ausreichend, um einen deutlichen Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle erkennen zu können. Der Hintergrund, der infolge einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers entstand, konnte weiterhin durch die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA 0,2%) verringert werden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Im Anschluss an drei weitere Waschschriffe mit PBS Tween 20 (3 x 5min) wurden die Platten kräftig ausgeklopft und das TMB-Substrat hinzugegeben. Dessen Reaktion mit der Peroxidase wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von Schwefelsäure (1:4 verdünnt) abgestoppt. Mittels des ELISA Readers wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 430nm gemessen (Referenzwellenlänge 620nm). Die mit NADL E2 erzielten OD-Werte wurden als oberer Schwellenwert des ELISAs festgelegt, bei dem die Bindung von E2 an CD46_{bov} als 100% bezeichnet wird. In entsprechender Weise wurde der mit Alfort E2 erzielte OD-Wert als der untere Schwellenwert („cut off“) festgesetzt, bei dem die Bindung an CD46_{bov} als negativ zu bewerten ist. Sowohl NADL E2 als auch Alfort E2-exprimierende Zellen wurden bei jedem ELISA als Kontrollen mitgeführt. Dadurch konnten interexperimentell auftretende Abweichungen der OD-Werte, z.B. infolge technischer Probleme oder Veränderungen im Zellstoffwechsel, relativiert werden. Beim Auftreten starker interexperimenteller Abweichungen der OD-Werte wurden die Ergebnisse jedoch verworfen und der ELISA wiederholt. Jede E2-Chimäre wurde im Duplikat in zwei voneinander unabhängigen ELISAs auf ihre CD46_{bov}-Bindungsaktivität getestet, jeweils parallel erfolgte deren immunhistochemischer Nachweis an der Zelloberfläche (2.2.1.7.2).

2.2.7 Bestimmung der E2-CD46_{bov}-Bindung unter Verwendung von löslichem NADL E2

Protein:	gereinigtes, lösliches NADL E2 (bereitgestellt von T. Krey) gereinigtes, lösliches CD46 _{bov} -Fc _{hum}
Antikörper:	Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA): Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Human IgG (1:8000)
Lösungen:	TBS + 0,05% Tween 20

TBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA

TMB-Substrat:

9ml TMB-Puffer (100mM Na-Acetat pH 5,2)

1ml TMB-Substrat-Stock (10mg TMB (Tetramethylbenzidine, Fa. Applichem) in 4ml DMSO)

1,5µl H₂O₂ (30%)

Stopplösung: H₂SO₄ konz. 1:4 verdünnt in H₂O_{bidest}

Gerät: ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT

Verbrauchsmaterial: ELISA-Platte, Fa. Nunc

Zunächst wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit 200ng gereinigtem, löslichem NADL E2 bzw. mit TBS beschichtet (über Nacht bei 4°C). Unter kräftigem Schütteln wurde die Platte drei Mal mit TBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend mit 1% BSA in TBS + 0,05% Tween 20 blockiert (1h bei 37°C). Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit 5µg CD46_{bov}-Fc_{hum} und der Nachweis dessen Bindung, wie bereits in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Das Inkubationsvolumen betrug für jeden Schritt jeweils 100µl/ „well“. Die Versuchsansätze wurden jeweils im Duplikat durchgeführt.

2.2.7.1 Untersuchung des Einflusses von anti-CD46-mAks auf die E2-CD46_{bov}-Bindung

Proteine: gereinigtes, lösliches NADL E2 (bereitgestellt von T. Krey)

gereinigtes, lösliches CD46_{bov}-Fc_{hum}

Antikörper: mAks BVD/ Ca 17, 26, 27 (gereinigt, Überstand)

Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween 20 + 0,2% BSA):

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Human IgG (1:8000)

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG (1:8000)

Lösungen: TBS + 0,05% Tween 20

TBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA

TMB-Substrat:

9ml TMB-Puffer (100mM Na-Acetat pH 5,2)

1ml TMB-Substrat-Stock (10mg TMB (Tetramethylbenzidine, Fa. Applichem) in 4ml DMSO)

1,5µl H₂O₂ (30%)

Stopplösung: H_2SO_4 konz. 1:4 verdünnt in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Gerät: ELISA Reader Spectra II, Fa. SLT

Verbrauchsmaterial: ELISA-Platte, Fa. Nunc

Die Platten wurden wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben vorbereitet und behandelt. Allerdings musste das Fusionsprotein $\text{CD46}_{\text{bov}}\text{-Fc}_{\text{hum}}$ vor der Zugabe auf die Platte mit den anti- $\text{CD46}_{\text{bov}}\text{-mAKs}$ präinkubiert werden, um deren hemmenden Effekt auf die $\text{E2-CD46}_{\text{bov}}\text{-Fc}_{\text{hum}}$ -Interaktion untersuchen zu können. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Volumen von $200\mu\text{l}$. Getestet wurden $100\mu\text{l}$ unverdünnter Überstand, bestehend aus gleichen Teilen der drei mAKs BVD/ Ca 17, 26, 27, sowie jeweils 10 bzw. $15\mu\text{g}$ der gereinigten Antikörper BVD/ Ca 17 und 26. Der Einsatz der doppelten bzw. dreifachen Menge an Antikörpern sollte das Vorkommen freier Antikörperbindungsstellen im CD46_{bov} vermeiden. Um einen spezifischen Hemmungseffekt nachzuweisen, wurde $\text{CD46}_{\text{bov}}\text{-Fc}_{\text{hum}}$ auch mit TBS präinkubiert (Negativkontrolle).

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation und Charakterisierung der für die Interaktion mit CD46_{bov} essentiellen Aminosäuren im NADL E2

In vorausgegangenen Studien konnte das Glykoprotein E2 von BVDV als Ligand des zellulären, bovinen Rezeptors CD46 (CD46_{bov}) identifiziert werden (Himmelreich 2003). Eine Interaktion des KSPV E2 mit CD46_{bov} war allerdings nicht nachweisbar, was es ermöglichte, die CD46_{bov}-Bindungsdomäne im BVDV E2 mit Hilfe von BVDV/ KSPV E2-Chimären zu bestimmen. Stellvertretend für BVDV wurde der Stamm NADL bzw. für KSPV der Stamm Alfort verwendet. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen des E2 der beiden Stämme, zeigen sie eine Identität von 63,6%, wobei sich deutlich variable von konservierten Bereichen abgrenzen lassen (Abb. 3). Es lag die Vermutung nahe, dass der Unterschied in der Rezeptornutzung auf die variablen Regionen zurückzuführen ist, was bei der Konstruktion der E2-Chimären berücksichtigt wurde. Je nach Größe und Verteilung der variablen Aminosäureabschnitte wurden ausgehend vom N- bzw. C-Terminus des NADL E2 zwischen 29-184 Aminosäuren gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 ausgetauscht. Die Interaktion der entstandenen E2-Chimären mit CD46_{bov} wurde anschließend in einem Zelladsorptionstest (Abb. 6) untersucht. Basierend auf dem Prinzip des Funktionsverlustes („*loss of function*“) gelang vorerst die Eingrenzung der für die CD46_{bov}-Bindung minimal benötigten NADL E2 Sequenz („*Minimalsequenz*“) auf die Aminosäuren 57-293 (Himmelreich 2003). Mit den bereits vorhandenen Konstrukten wurde im Rahmen dieser Arbeit ein modifiziertes Experiment durchgeführt, das es ermöglichte, den für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Bereich innerhalb des NADL E2 auf die Aminosäuren 57-274 weiter einzuengen (Daten nicht gezeigt).

Damit sich die chimären E2 Proteine nicht im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ansammelten, sondern an der Zelloberfläche exprimiert werden konnten, wurden sie am C-Terminus mit der Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Hämagglutinin (Influenza HA) fusioniert (Zhou et al., 1998; Himmelreich 2003). Als Vektor für die Nukleinsäuresequenz des Fusionsproteins diente das Plasmid pcDNA3, das neben dem viralen Promotor des humanen Zytomegalie-Virus (hCMV) auch über einen T7-RNS-Polymerase Promotor verfügt. Letzterer ermöglicht in Vaccinia Virus MVAT7 infizierten, eukaryotischen Zellen die Synthese von mRNS ausgehend vom transfizierten

dargestellt mit Hilfe derer die „*Minimalsequenz*“ von Aminosäure 57-274 (rot markiert) identifiziert werden konnte. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn X Thr/Ser) innerhalb der beiden E2 Proteine sind schwarz umrahmt, wobei Alfort E2 zwei zusätzliche N-Glykosylierungsstellen besitzt.

3.1.1 Herstellung von NADL/ Alfort Glykoprotein E2-Chimären durch Austausch variabler Sequenzbereiche im NADL E2

Im NADL E2 sollte die für die CD46_{bov}-Bindung benötigte „*Minimalsequenz*“ (Aminosäure 57 bis 274) weiter eingengt werden. Dazu wurden NADL/ Alfort E2-Chimären hergestellt (Abb. 4b), mit Hilfe derer die Bedeutung einzelner Aminosäureabschnitte innerhalb des NADL E2 für die Bindung an CD46_{bov} analysiert werden konnte. Die Länge der untersuchten Bereiche lag zwischen drei bis zwölf Aminosäuren (Abb. 4a), was einerseits von der Größe der variablen Bereiche, andererseits auch von den klonierungstechnischen Möglichkeiten abhängig war. Da keine geeigneten Restriktionsstellen in den Molekülen von NADL und Alfort E2 vorhanden sind, mussten die Austausche über ortsgerichtete Mutagenese in die NADL E2 Sequenz eingeführt werden.

Das Ausgangskonstrukt für die PCR war der Vektor pcDNA3 mit der Nukleinsäuresequenz des unveränderten NADL E2. Das 3'-Ende, welches für den hydrophoben Anteil des NADL E2 kodiert, wurde durch die Nukleinsäuresequenz der Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Hämagglutinin (Influenza HA) ersetzt (pAH 43 (Himmelreich 2003)). Für die Insertion der Mutationen in das NADL E2 waren spezifische Oligonukleotide nötig. Die Kontrolle der eingeführten Mutationen in den Plasmiden erfolgte über eine Sequenzanalyse. Im Folgenden werden die vorgenommenen Austausche auf Aminosäureebene angegeben.

Ein besonderes Augenmerk lag auf den Cysteinen (C) an Position 59 und 105 im NADL E2, denn sie sind innerhalb aller BVDV-Isolate konserviert, kommen aber bei Stämmen der Spezies KSPV nicht vor. Cysteine sind schwefelhaltige Aminosäuren, welche in der Lage sind mit einem anderen Cystein Disulfidbrücken auszubilden, die für den Erhalt und die Stabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur sowie die Funktionstüchtigkeit eines Proteins notwendig sind. Beim Austausch der Aminosäuren 55-63 im NADL E2 wurde daher das Cystein an Position 59 (C59) zunächst nicht ausgetauscht (NADL E2 (Alfort 55-63/C59)). Dennoch sollte geklärt werden, ob durch die ungleiche Anzahl an Cysteinen unterschiedliche

Konformationen des BVDV E2 und KSPV E2 hervorgerufen werden, was für den Unterschied in der Nutzung von CD46_{bov} verantwortlich sein könnte. Dazu wurden die beiden Cysteine C59 und C104 im NADL E2 eigens durch die analogen Aminosäuren im Alfort E2 ersetzt (NADL E2 (Alfort59/ 104)).

Ein weiterer bedeutsamer Unterschied befindet sich an Position 122 und 261 des E2. Hierbei handelt es sich um potentielle N-Glykosylierungsstellen, welche innerhalb der Spezies KSPV konserviert, jedoch bei den meisten BVDV-Stämmen nicht vorhanden sind. N-Glykosylierungsstellen erkennt man anhand des Aminosäuremotivs Asparagin-X-Threonin bzw. Asparagin-X-Serin, jedoch bedeutet das Vorhandensein eines Glykosylierungsmotivs nicht in jedem Fall auch die Glykosylierung desselbigen. Die Glykosylierung eines Proteins ist wichtig für seine Stabilität, schützt es vor proteolytischem Abbau und nimmt Einfluss auf dessen Konformation, was die Affinität zum Bindungspartner beeinflussen kann. Inwiefern die N-Glykosylierungsstellen die Bindung von E2 an CD46_{bov} beeinflussen, sollte mit dem Austausch der Sequenzbereiche 124-127 (NADL E2 (Alfort 124-127)) und 258-261 (NADL E2 (Alfort 258-261)) untersucht werden.

[illegible]

b)

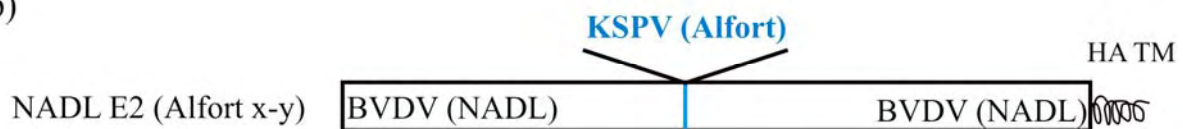


Abb. 4: Sequenzvergleich der Glykoproteine NADL und Alfort E2/ Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären

In Abbildung 4a) sind die Aminosäuresequenzen von NADL und Alfort E2 dargestellt. Die blauen Rahmen kennzeichnen die einzelnen Sequenzabschnitte, welche innerhalb des NADL E2 gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 ausgetauscht wurden. Die blau markierten Cysteine an Position

59 und 105 sind zwischen den E2 Proteinen der Spezies BVDV und KSPV nicht konserviert. Ihr Einfluss auf die CD46_{bov}-Bindung sollte mittels einer gesonderten Chimäre getestet werden.

In 4b) ist der Aufbau der Chimären schematisch dargestellt. Der C-terminal gelegene, hydrophobe Anteil des NADL E2 wurde durch die Transmembrandomäne und die zytosolische Domäne des Influenza Hämagglutinins (HA TM) ersetzt, damit das Protein an der Zelloberfläche exprimiert werden kann. Der blaue Balken symbolisiert einen Sequenzabschnitt innerhalb des NADL E2, welcher durch die analoge Sequenz von Alfort E2 ersetzt wird. Die Bezeichnung der Chimären ergibt sich aus ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Position des Sequenzabschnitts, der durch die analoge Sequenz des Alfort E2 ersetzt wurde (Alfort x-y).

3.1.2 Western Blot Analyse und immunhistochemischer Nachweis der Expression der chimären E2 Proteine

Damit die E2-Chimären im Zelladsorptionstest verwendet werden konnten, mussten sie zwei Bedingungen erfüllen. Zum einen musste sichergestellt werden, dass sie nach der Transfektion in Zellen exprimiert und zur Oberfläche transportiert werden. Zum anderen sollten sie ebenso wie das unveränderte NADL E2 (pAH 43) in der Lage sein, disulfidverbrückte Dimere zu bilden.

Hierfür wurden BHK-Zellen zunächst mit Vaccinia Virus MVAT7 infiziert und anschließend mit den Plasmiden transfiziert (2.2.1.4). Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C wurde ein Teil der Zellen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und das E2 immunhistochemisch mittels des indirekten Immunperoxidase Assays an deren Oberfläche nachgewiesen (2.2.1.7.1). Der andere Teil der Zellen wurde lysiert und das Vorliegen von monomerem und dimerem E2 im Western Blot (2.2.4.3) untersucht.

Zur Detektion der E2 Proteine wurde der monoklonale Antikörper 65A verwendet (Cedillo Rosales 2004), der nicht nur mit dem Glykoprotein E2 von NADL, sondern auch nach Überexpression mit dem von Alfort interagiert.

Für alle NADL/ Alfort E2-Chimären konnte sowohl eine Expression an der Zelloberfläche (Tab .1) als auch monomeres und dimeres Protein detektiert werden. In der Western Blot Analyse fiel jedoch auf, dass die Chimären NADL E2 (Alfort 55-63/C59) und NADL E2 (Alfort 87-92) deutlich schlechter erkannt werden als das Wildtyp NADL E2 (Abb. 5). Es lag die Vermutung nahe, dass es durch den Sequenzaustausch im E2 Protein zu einer Zerstörung

oder Veränderung des Epitopes des mAKs 65A gekommen sein könnte. Um diesen Verdacht zu überprüfen, wurde der E2-Nachweis mit anderen verfügbaren monoklonalen Antikörpern (z.B. 10B8 und D5) wiederholt. Nachdem mit diesen Antikörpern dieselben Ergebnisse wie mit dem mAk 65A erzielt worden waren, wurden die immunhistochemisch gefärbten Zellen genauer betrachtet. Es fiel auf, dass im Vergleich zum Wildtyp (wt) NADL E2 die Expressionseffizienz der einzelnen E2-Chimären variierte. Die chimären Proteine NADL E2 (Alfort 55-63/C59) und NADL E2 (Alfort 87-92) konnten nur von 20-40% der transfizierten BHK-Zellen exprimiert werden. Die Intensität deren immunhistochemischer Färbung blieb verglichen mit wt NADL E2 allerdings unverändert.

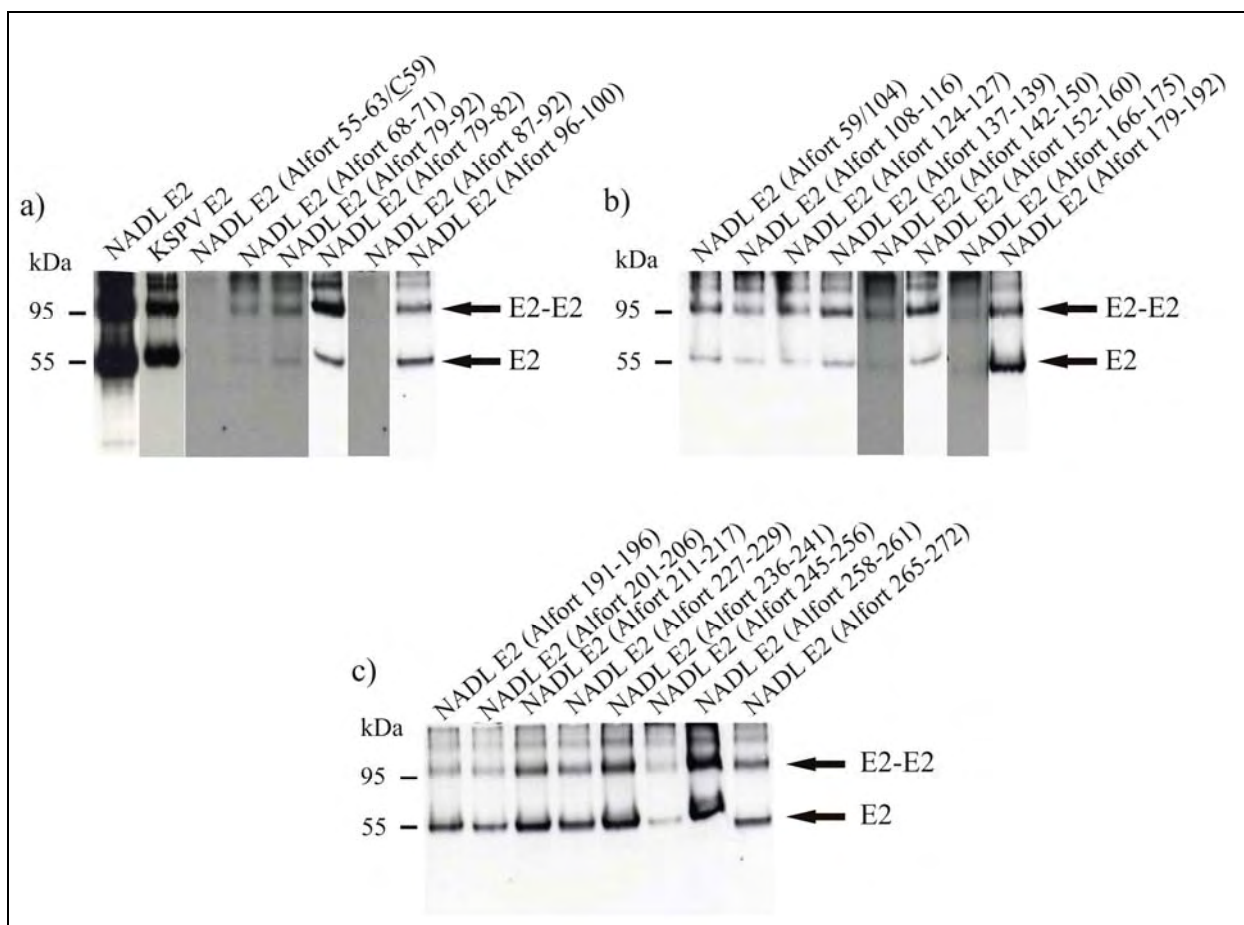


Abb. 5: Western Blot Analyse der NADL/ Alfort E2-Chimären

BHK-Zellen wurden nach Infektion mit MVAT7 mit den in a-c) angegebenen NADL/ Alfort E2-Chimären transfiziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden unter nicht reduzierten Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert,

welche danach mit dem monoklonalen anti-E2-Antikörper 65A inkubiert wurde. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte über einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Entsprechend den Kontrollen sind die Chimären in der Lage, monomeres und dimeres E2 zu bilden, jedoch sind Unterschiede in der Expressionsstärke erkennbar. Die Pfeile kennzeichnen das monomere E2 (~55kDa) und das dimere E2 (~110kDa).

3.1.3 Untersuchung des Einflusses ausgetauschter Sequenzabschnitte auf die CD46_{bov}-Bindung im Zelladsorptionstest

Der Zelladsorptionstest ermöglichte es, die Bindung zwischen bovinem CD46 und den NADL/ Alfort E2-Chimären qualitativ zu bestimmen.

Es wurden dafür so genannte Fängerzellen und Indikatorzellen benötigt. Die Fängerzellen lagen als konfluenter Monolayer vor und exprimierten transient die chimären E2 Proteine. Hierfür wurden sie zu Beginn des Experimentes 1h bei 37°C mit MVAT7 infiziert und anschließend mit einem das chimäre E2 kodierenden Plasmid transfiziert. Als Fängerzellen wurden BHK-Zellen verwendet, da sie sich besonders gut transfizieren lassen. Als Indikatorzellen wurden 38A₁D-Zellen verwendet, eine Schweine-Lymphomzelllinie, die rekombinantes, bovines CD46 exprimiert (38A₁D-CD46_{bov}). Vor der Zugabe der Indikatorzellen auf die Fängerzellen wurden die Indikatorzellen mit dem zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoff Calcein inkubiert (Abb. 6). Anschließend wurden die BHK-Zellen mehrmals mit DMEM/- (DMEM ohne Antibiotika und FKS) gewaschen und die Bindung mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

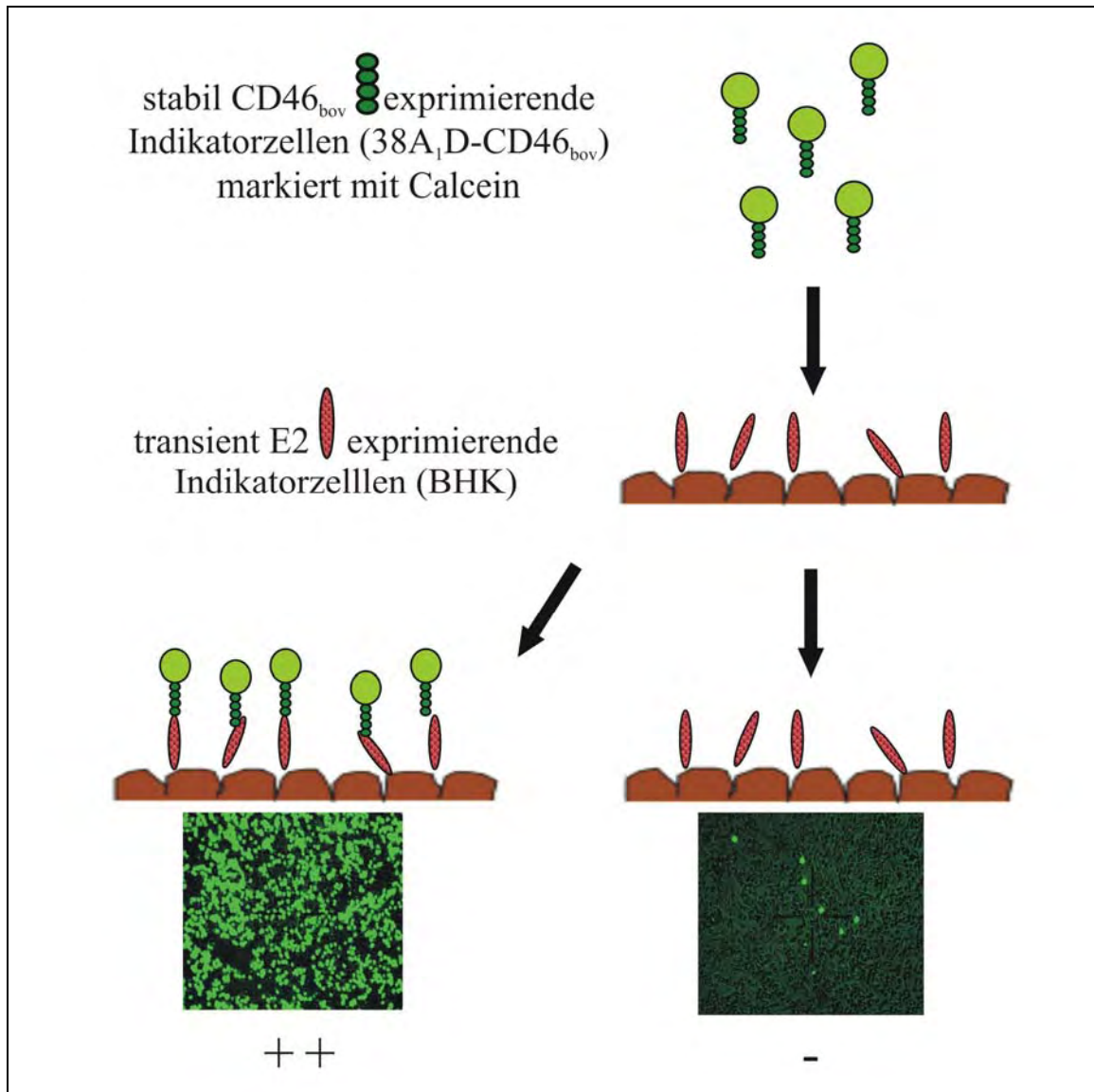


Abb. 6: Schema des Zelladsorptionstests

Die stabil CD46_{bov}-exprimierenden Indikatorzellen werden mit dem zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoff Calcein für 30min inkubiert, bevor sie auf die Fängerzellen gegeben werden, welche bereits im Vorfeld mit für E2 kodierenden Plasmiden transfiziert wurden. Die Auswertung des Zelladsorptionstests erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nach stattgefundener Bindung von E2 und CD46_{bov} können zahlreiche fluoreszierende Zellen detektiert werden (++). Kommt es zu keiner Wechselwirkung der beiden Proteine werden nur vereinzelt, unspezifisch gebundene Zellen gefunden (-).

Die Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1) zusammengefasst.

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (Alfort 55-63/C59)	-	+
NADL E2 (Alfort 68-71)	++	++
NADL E2 (Alfort 79-82)	++	++
NADL E2 (Alfort 87-92)	++	+
NADL E2 (Alfort 79-92)	++	++
NADL E2 (Alfort 96-100)	++	++
NADL E2 (Alfort 59/ 104)	++	++
NADL E2 (Alfort 108-116)	++	++
NADL E2 (Alfort 124-127)	++	++
NADL E2 (Alfort 137-139)	++	++
NADL E2 (Alfort 142-150)	++	++
NADL E2 (Alfort 152-160)	++	++
NADL E2 (Alfort 166-175)	++	++
NADL E2 (Alfort 179-182)	-	++
NADL E2 (Alfort 191-196)	++	++
NADL E2 (Alfort 201-206)	++	++
NADL E2 (Alfort 211-217)	++	++
NADL E2 (Alfort 227-229)	++	++
NADL E2 (Alfort 236-241)	++	++
NADL E2 (Alfort 245-256)	-	++

NADL E2 (Alfort 258-261)	++	++
NADL E2 (Alfort 265-272)	-	++

Tab. 1: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises der NADL/ Alfort E2-Chimären

Für die beiden Testverfahren wurden BHK-Zellen mit den NADL/ Alfort E2-Chimären transfiziert. Danach wurde der Zelladsorptionstest durchgeführt (Abb. 6) und ausgewertet. Dabei konnte für die Chimären NADL E2 (Alfort 55-63/C59), NADL E2 (Alfort 179-182), NADL E2 (Alfort 245-256) und NADL E2 (Alfort 265-272) keine Bindung von Calcein-markierten 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die chimären E2 Proteine unter Verwendung des mAks 65A an der Zelloberfläche nachgewiesen. Für die Chimären NADL E2 (Alfort 55-63/C59) und NADL E2 (Alfort 87-92) wurde eine deutlich reduzierte Oberflächenexpression festgestellt. (-) keine Bindung; (+) reduzierte Bindung; (++) unveränderte Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen

Das bovine CD46 konnte im Zelladsorptionstest an nahezu alle E2-Chimären binden, so z.B. auch an NADL E2 (Alfort 59/ 104), NADL E2 (Alfort 124-127) und NADL E2 (Alfort 258-261). Dies bedeutet, dass weder die Cysteine noch die potentiellen N-Glykosylierungsstellen einen Einfluss auf die Bindung von NADL E2 an den zellulären Rezeptor CD46_{bov} haben.

Im Falle der E2-Chimären NADL E2 (Alfort 55-63/C59), NADL E2 (Alfort 179-182), NADL E2 (Alfort 245-256) und NADL E2 (Alfort 265-272) konnte jedoch keine Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen festgestellt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ im NADL E2 wahrscheinlich um relevante Bereiche für die Bindung an bovines CD46 handelt (Abb. 7). Die klein geschriebenen Aminosäuren sind zwischen NADL und Alfort E2 konserviert.

Die Aminosäuresequenzen von NADL und Alfort E2 wurden verglichen. Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Die blauen Rahmen markieren die vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ innerhalb des NADL E2, nach deren Austausch gegen die analogen Sequenzen des Alfort E2 ein Verlust der CD46_{bov}-Bindung aufgetreten war. Die klein geschriebenen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen stehen für die zwischen NADL und Alfort E2 konservierten Aminosäuren.

3.1.4 Identifizierung der für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ des NADL E2

Um die Bedeutung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ für die CD46_{bov}-Bindung näher untersuchen zu können, wurden die Sequenzabschnitte in zwei bis drei Unterabschnitte eingeteilt (Abb. 8). Diese wurden dann in verschiedenen Kombinationen durch die analogen Aminosäuresequenzen des Alfort E2 ersetzt und der Einfluss jedes einzelnen Abschnittes auf die Bindung von NADL E2 an CD46_{bov} im Zelladsorptionstest analysiert. Wurde ein für die Rezeptorbindung essentieller Unterabschnitt verändert, so kam es zu einem Verlust der CD46_{bov}-Bindung, wohingegen der Austausch eines nicht relevanten Sequenzbereiches keinen Verlust der Bindung an CD46_{bov} zur Folge hatte. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse des immunhistochemischen E2-Nachweises und des Zelladsorptionstests zusammengefasst.

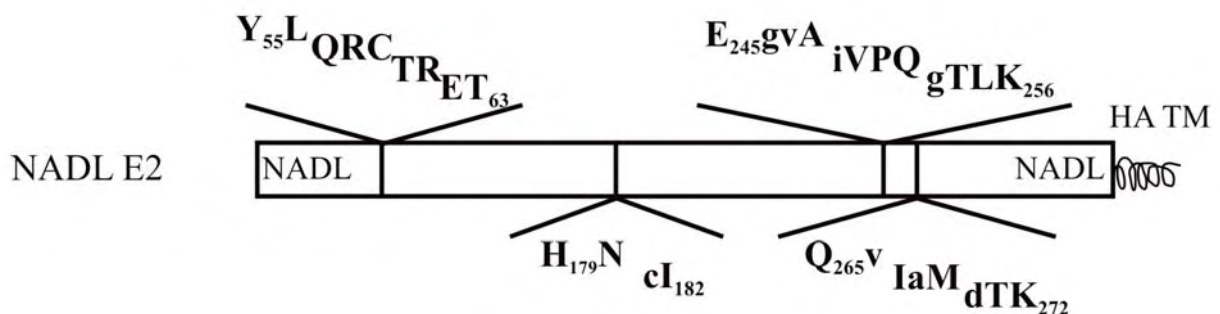


Abb. 8: Schematische Darstellung der Unterabschnitte innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ des NADL E2
Gezeigt ist das NADL E2 mit der C-terminalen Transmembran- und der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Hämagglutinins (HA TM). Die vier Sequenzabschnitte sind hervorgehoben und ihre ungefähre Position im NADL E2 mittels Balken markiert. Die Unterabschnitte innerhalb der Peptidsequenzen sind versetzt zueinander dargestellt.

3.1.4.1 Charakterisierung der Aminosäuren der Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃

Die Aminosäuresequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ wurde in vier Abschnitte bestehend aus jeweils zwei bzw. drei zwischen NADL E2 und Alfort E2 nicht konservierten Aminosäuren unterteilt. Beim Austausch der verschiedenen Abschnitte gegen die analoge Sequenz des Alfort E2 blieb das Cystein59 (C) jedoch immer erhalten, um durch eine ungleiche Anzahl an Cysteinen die Stabilität des Proteins nicht zu beeinträchtigen. Die Bezeichnung der in diesem Kapitel beschriebenen Proteine setzt sich aus ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz im Bereich 55-63 zusammen (Abb. 9). Die Plasmide zur Charakterisierung der vier Untereinheiten entstanden mittels ortsgerichteter Mutagenese auf Basis des Plasmids NADL E2 (Alfort 55-63/C₅₉).

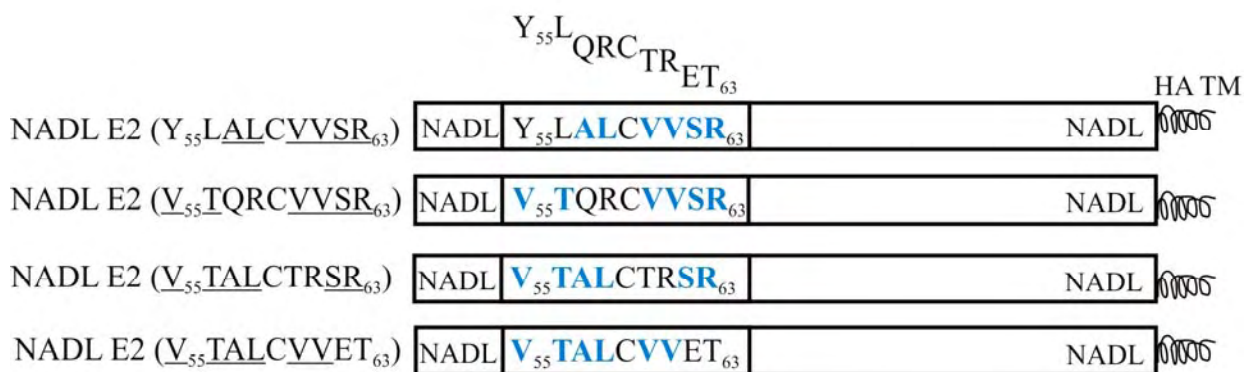


Abb. 9: Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären zur Charakterisierung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃

Der Sequenzabschnitt Y₅₅LQRCTRET₆₃ innerhalb des NADL E2 wurde in vier Abschnitte bestehend aus je zwei bzw. drei Aminosäuren unterteilt. In den gezeigten NADL/ Alfort E2-Chimären wurde jeweils ein Unterabschnitt mit der Originalsequenz beibehalten und der Rest gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 (blau) ersetzt. In allen Fällen blieb das Cystein59 (C) erhalten. Die Benennung der Chimären ergibt sich aus ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz innerhalb des Bereiches 55-63. Die Aminosäuren des Alfort E2 sind im Namen unterstrichen.

Die chimären E2 Proteine, NADL E2 (V₅₅TQRCVVSR₆₃), NADL E2 (V₅₅TALCTRSR₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) konnten immunhistochemisch an der Zelloberfläche

nachgewiesen werden, jedoch war die Expression des Proteins NADL E2 (Y₅₅LALCVVSR₆₃) verglichen mit Wildtyp NADL E2 deutlich reduziert.

Im Zelladsorptionstest stellte sich heraus, dass NADL E2 (Y₅₅LALCVVSR₆₃) nicht in der Lage ist, CD46_{bov} zu binden. Daher sind die Aminosäuren Tyrosin55 (Y) und Leucin56 (L) trotz reduzierter Oberflächenexpression des chimären Proteins als irrelevant für die CD46_{bov}-Bindung einzustufen. Unterstützt wird die Aussage dadurch, dass der Austausch der Aminosäuren 1-56 im NADL E2 durch die des Alfort E2 nicht zum Verlust der CD46_{bov}-Bindung führten (Himmelreich 2003). Die Chimäre NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) konnte eine zu nativem NADL E2 vergleichbare Menge an 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen binden, während NADL E2 (V₅₅TQRCVVSR₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCTRSR₆₃) eine reduzierte Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen aufwiesen (Tab. 2).

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (Y ₅₅ L <u>AL</u> CVVSR ₆₃)	-	+
NADL E2 (V ₅₅ TQRCVVS <u>R</u> ₆₃)	+	++
NADL E2 (V ₅₅ T <u>AL</u> CTR <u>S</u> R ₆₃)	+	++
NADL E2 (V ₅₅ T <u>AL</u> CVVET ₆₃)	++	++

Tab. 2: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises

Für die Chimäre NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) konnte eine Bindung von Calcein-markierten 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen im Zelladsorptionstest eindeutig nachgewiesen werden (++), hingegen war sie für NADL E2 (V₅₅TQRCVVSR₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCTRSR₆₃) reduziert (+). NADL E2 (Y₅₅LALCVVSR₆₃) zeigte nur eine reduzierte Expression des Proteins an der Zelloberfläche und keinerlei erkennbare Adsorption von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen (-).

Den Aminosäuren Glutaminsäure62 (E) und Threonin63 (T) kommt eine besondere Bedeutung bei der CD46_{bov}-Bindung zu. Welche der beiden Aminosäuren jedoch tatsächlich für die Rezeptorbindung verantwortlich ist, sollte überprüft werden, indem die gesamte

Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ bis auf Cystein59 und Glutaminsäure62 oder Threonin63 gegen die analoge KSPV Sequenz ersetzt wurde (Abb. 10).



Abb. 10: Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären zur näheren Charakterisierung von Glutaminsäure62 und Threonin63

Nachdem im Zelladsorptionstest für die E2-Chimäre NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) eine zu nativem NADL E2 vergleichbare Menge gebundener 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen detektierbar war, wurden die beiden Chimären NADL E2 (V₅₅TALCVVER₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCVVST₆₃) hergestellt, deren Aufbau hier schematisch gezeigt ist. Die Chimären werden nach ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz innerhalb des Bereiches 55-63 benannt. Die Aminosäuren des Alfort E2 sind im Namen unterstrichen bzw. im Schema blau markiert.

Sowohl NADL E2 (V₅₅TALCVVER₆₃) als auch NADL E2 (V₅₅TALCVVST₆₃) wiesen eine reduzierte CD46_{bov}-Bindung auf (Tab. 3).

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>TALCVVER</u> ₆₃)	+	++
NADL E2 (<u>V</u> ₅₅ <u>TALCVVST</u> ₆₃)	+	++

Tab. 3: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises

NADL E2 (V₅₅TALCVVER₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCVVST₆₃) konnten im immunhistochemischen Nachweisverfahren mit dem monoklonalen anti-E2-Antikörper 65A detektiert werden (++). Beide zeigten im Vergleich zu NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) eine verminderte Bindung von Calcein-markierten 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen (+).

3.1.4.2 Untersuchung der Relevanz der Aminosäuren der Peptidsequenz H₁₇₉NcI₁₈₂

Die Aminosäuresequenz H₁₇₉NcI₁₈₂ innerhalb des NADL E2 wurde in zwei Unterabschnitte, bestehend aus je zwei Aminosäuren, unterteilt. Dabei ist das Cystein180 (C) zwischen NADL und Alfort E2 konserviert (Abb. 11). Als Template für die ortsgerichtete Mutagenese wurde das Plasmid NADL E2 (Alfort 179-182) verwendet.

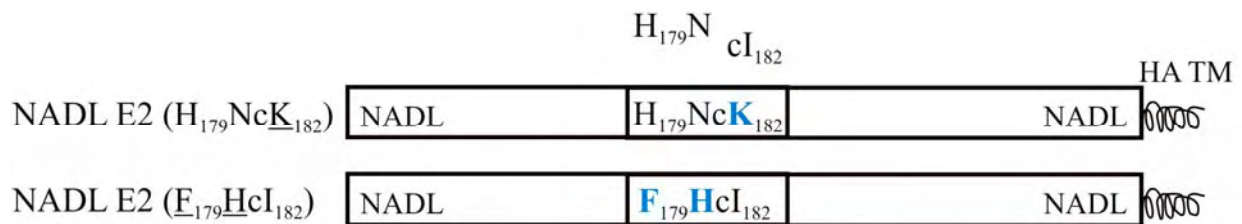


Abb. 11: Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären zur Charakterisierung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz H₁₇₉NcI₁₈₂

Die zwei Unterabschnitte innerhalb der Peptidsequenz H₁₇₉NcI₁₈₂ wurden durch die analogen Aminosäuren des Alfort E2 (blau) ersetzt. Das zwischen NADL und Alfort E2 konservierte Cystein ist als Kleinbuchstabe dargestellt. Die Benennung der Chimären ergibt sich aus ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz innerhalb des Bereiches 179-182. Die Aminosäuren des Alfort E2 sind unterstrichen.

Der Austausch der Aminosäuren Histidin179 (H) und Asparagin180 (N) innerhalb des Oligopeptides H₁₇₉NcI₁₈ durch die analogen Aminosäuren des Alfort E2 (NADL E2 (F₁₇₉HcI₁₈₂)) führten zu einem Verlust der Bindung von NADL E2 an CD46_{bov}. Hingegen hatte der Austausch des Isoleucins182 (I) gegen Lysin (K) (NADL E2 (H₁₇₉NcK₁₈₂)) keinen Einfluss auf die Wechselwirkung der beiden Proteine (Tab. 4).

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (H ₁₇₉ Nc <u>K</u> ₁₈₂)	++	++
NADL E2 (<u>F</u> ₁₇₉ <u>H</u> cI ₁₈₂)	-	++

Tab. 4: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises der E2-Chimären zur näheren Charakterisierung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz H₁₇₉NcI₁₈₂

Die beiden E2-Chimären NADL E2 (H₁₇₉NcK₁₈₂) und NADL E2 (F₁₇₉HcI₁₈₂) wurden beide an der Zelloberfläche von BHK-Zellen exprimiert, jedoch kam es im Zelladsorptionstest nur zwischen NADL E2 (H₁₇₉NcK₁₈₂) und CD46_{bov} zu einer nachweisbaren Wechselwirkung.

3.1.4.3 Bedeutung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆

Beim Vergleich der Aminosäuren 245 bis 256 des NADL E2 mit denen des Alfort E2 fiel auf, dass Glycin₂₄₆ (G), Valin₂₄₇ (V), Isoleucin₂₄₉ (I) und Glycin₂₅₃ (G) konserviert sind. Die Unterabschnitte innerhalb der Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ wurden daher so gewählt, dass sie aus je zwei oder drei variablen Aminosäuren bestanden. Auf diese Weise entstanden der N-terminale (E₂₄₅gvA₂₄₈), der mittlere (i₂₄₉VPQ₂₅₂) und der C-terminale (g₂₅₃TLK₂₅₆) Abschnitt. Die Kleinbuchstaben markieren die genannten konservierten Aminosäuren. Die Kodons der variablen Aminosäuren von je zwei Abschnitten wurden in verschiedenen Kombinationen durch die Kodons der analogen Aminosäuren des Alfort E2 mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht (Abb. 12). Dabei diente das Plasmid NADL E2 (Alfort 245-256) als „Template“ DNS.

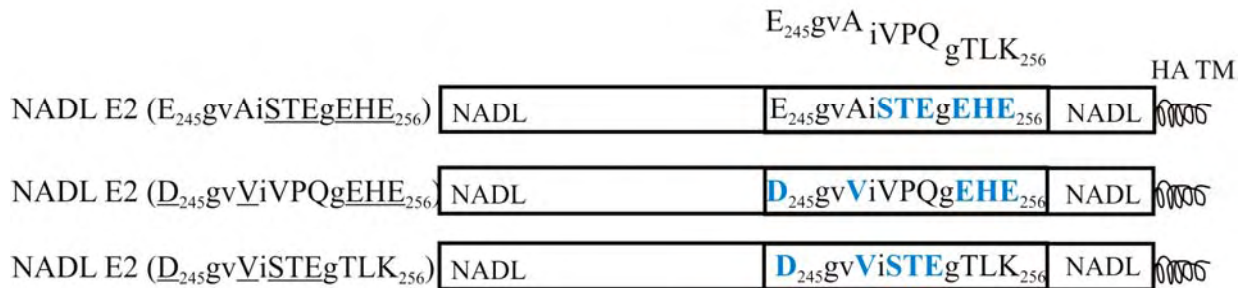


Abb. 12 Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären zur Charakterisierung der Aminosäuren der Peptidsequenz $E_{245}gvA_iVPQ_gTLK_{256}$

Der Sequenzabschnitt $E_{245}gvA_iVPQ_gTLK_{256}$ wurde in drei Unterabschnitte unterteilt. Davon wurden je zwei in verschiedenen Kombinationen gegen die Aminosäuresequenzen des Alfort E2 (blau) ausgetauscht. Die ausgetauschten Aminosäuren sind im Namen der entstanden E2-Chimären unterstrichen. Die klein geschriebenen Buchstaben stellen die zwischen NADL und Alfort E2 konservierten Aminosäuren dar.

Trotz erfolgreicher Expression der drei Chimären NADL E2 ($E_{245}gvA_i\text{STEGEHE}_{256}$), NADL E2 ($D_{245}gvV_iVPQgEHE_{256}$) bzw. NADL E2 ($D_{245}gvV_iSTEGTLK_{256}$), wies keine im Zelladsorptionstest eine Bindung an $CD46_{bov}$ auf (Tab. 5)

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 ($E_{245}gvA_i\text{STEGEHE}_{256}$)	-	++
NADL E2 ($D_{245}gvV_iVPQgEHE_{256}$)	-	++
NADL E2 ($D_{245}gvV_iSTEGTLK_{256}$)	-	++

Tab. 5: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen E2 Nachweises für die Chimären NADL E2 ($E_{245}gvA_i\text{STEGEHE}_{256}$), NADL E2 ($D_{245}gvV_iVPQgEHE_{256}$) und NADL E2 ($D_{245}gvV_iSTEGTLK_{256}$)

Obwohl die drei chimären E2 Proteine mit dem mAk 65A an der Zelloberfläche immunhistochemisch nachweisbar waren, konnte im Zelladsorptionstest keine Bindung Calcein-markierter $38A_1D$ - $CD46_{bov}$ -Zellen beobachtet werden.

Es wurde vermutet, dass die für die Rezeptorbindung verantwortlichen Aminosäuren in zwei benachbarten Abschnitten liegen, weshalb in den folgenden Plasmiden nur die Aminosäuren des N-terminalen bzw. des C-terminalen Abschnittes durch die des Alfort E2 ersetzt wurden (Abb. 13).

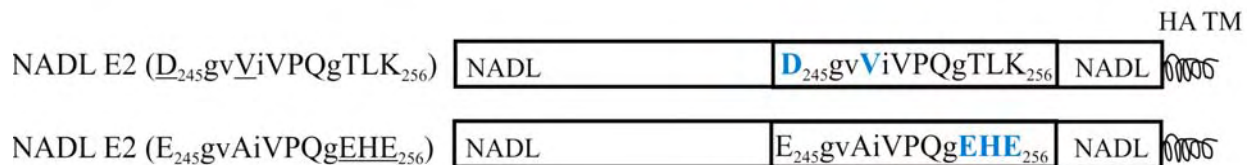


Abb. 13: Schematische Darstellung der E2-Chimären NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆)

Nachdem eine Aussage über die Relevanz der Aminosäuren innerhalb des Sequenzbereiches E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ mit den zuvor beschriebenen Chimären nicht möglich war (Abb. 12), sollte nur der N-terminale bzw. der C-terminale Sequenzabschnitt der Peptidsequenz durch die analoge Alfort E2 Sequenz ersetzt werden. Die resultierenden E2 Proteine NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆) sind hier dargestellt. Der Name der E2-Chimären setzt sich aus deren Hauptbestandteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz innerhalb des Bereiches 245-256 zusammen. Konservierte Aminosäuren sind als Kleinbuchstaben dargestellt.

Die Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises der entstandenen Chimären NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆) sind in Tab. 6 dargestellt.

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gv <u>V</u> iVPQgTLK ₂₅₆)	-	++
NADL E2 (E ₂₄₅ gvAiVPQg <u>EHE</u> ₂₅₆)	-	++

Tab. 6: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises für die Chimären NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆)

Die chimären E2 Proteine ließen sich zwar mittels des mAks 65A an der Zelloberfläche detektieren, jedoch war im Zelladsorptionstest keine Bindung von Calcein-markierten 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen festzustellen.

Die bisherigen Ergebnisse ließen nur die Aussage zu, dass sowohl im N-terminalen als auch im C-terminalen Sequenzabschnitt Aminosäuren vorhanden sind, welche sich an der Bindung an CD46_{bov} beteiligen. Die Bedeutung des mittleren Abschnitts war zu diesem Zeitpunkt ungeklärt. Zunächst wurde der N-terminale Abschnitt näher untersucht, welcher nur die beiden variablen Aminosäuren Glutaminsäure₂₄₅ (E) und Alanin₂₄₈ (A) enthielt. Tauscht man nun die für die CD46_{bov}-Bindung relevante Aminosäure gegen die analoge Aminosäure des Alfort E2 aus, so kommt es zu einem Verlust der Interaktion mit CD46_{bov}. Es wurde nun Glutaminsäure₂₄₅ (E) gegen Asparaginsäure (D) ersetzt (Abb. 14). Das entstandene Konstrukt NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) war noch immer in der Lage, an CD46_{bov} zu binden (Tab. 7), weshalb wahrscheinlich das Alanin₂₄₈ (A) in der CD46_{bov}-Bindung involviert ist.

Für die Charakterisierung des C-terminalen Abschnittes wurde die Chimäre NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHK₂₅₆) hergestellt (Abb. 14). Infolge des Austausches des Threonins₂₅₄ (T) und des Leucins₂₅₅ (L) gegen die analogen Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Histidin (H) kam es zu einem Verlust der CD46_{bov}-Bindung. Dies deutete an, dass es sich hierbei um für die Rezeptorbindung essentielle Aminosäuren handelt. Da die Mutanten NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHK₂₅₆) jedoch eine reduzierte Oberflächenexpression aufwiesen, wurde mittels der Mutante NADL E2

(D₂₄₅gvAiVPQgTLE₂₅₆) der Einfluss der Aminosäuren Alanin250 (A), Threonin254 (T) und Leucin255 (L) auf die CD46_{bov}-Bindung verifiziert (Abb. 14). Tauschte man nun innerhalb der Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ die Glutaminsäure245 (E) gegen die Asparaginsäure (D) und das Lysin256 (K) gegen Glutaminsäure (E), war die E2-Chimäre noch immer in der Lage, an bovines CD46 zu binden (Tab. 7). Um die Bedeutung des mittleren Abschnittes zu untersuchen, wurde das Triplet aus Valin250 (V), Prolin251 (P) und Glutamin252 (Q) gegen Serin (S), Threonin (T) und Glutaminsäure (E) ausgetauscht (Abb. 14). Nachdem im Zelladsorptionstest für die entstandene Chimäre NADL E2 (D₂₄₅gvAiSTEgTLK₂₅₆) keine Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen nachweisbar war (Tab. 7), wurde auch dieser Abschnitt als relevant für die CD46_{bov}-Bindung eingestuft.

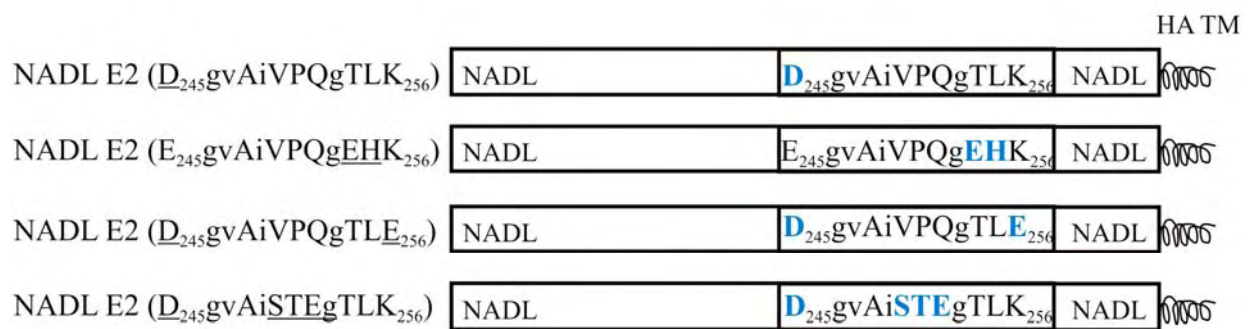


Abb. 14: Schematische Darstellung der E2-Chimären zur Charakterisierung des Einflusses der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆

Mittels den hier dargestellten E2-Chimären NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆), NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHLK₂₅₆), NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLE₂₅₆) und NADL E2 (D₂₄₅gvAiSTEgTLK₂₅₆) sollte geklärt werden, welche Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ an der Bindung an bovines CD46_{bov} beteiligt sind. Die von Alfort stammenden Aminosäuren innerhalb des Aminosäureabschnittes 245-256 sind blau gekennzeichnet bzw. unterstrichen. Die zwischen NADL und Alfort E2 konservierten Aminosäuren sind klein geschrieben.

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAiVPQgTLK ₂₅₆)	++	+
NADL E2 (E ₂₄₅ gvAiVPQg <u>E</u> HK ₂₅₆)	-	+
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAiVPQgTLE ₂₅₆)	++	++
NADL E2 (<u>D</u> ₂₄₅ gvAi <u>S</u> TEgTLK ₂₅₆)	-	++

Tab. 7: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises für die chimären Proteine NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆), NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHK₂₅₆), NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLE₂₅₆) und NADL E2 (D₂₄₅gvAiSTEgTLK₂₅₆)

Im Zelladsorptionstest konnte nur für NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLE₂₅₆) eine Interaktion mit CD46_{bov} beobachtet werden, wobei sich das Protein NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) nur eingeschränkt immunhistochemisch nachweisen ließ. Ebenfalls deutlich reduziert war die Oberflächenexpression des chimären E2 Proteins NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHK₂₅₆).

3.1.4.4 Analyse der für die CD46_{bov}-Bindung verantwortlichen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂

Innerhalb des Sequenzabschnittes Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ sind drei Aminosäuren zwischen NADL und Alfort E2 konserviert (Valin266 (V), Alanin268 (A) und Apsaraginsäure270 (D)). Zur Bestimmung der für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Aminosäuren wurde der Sequenzbereich von Aminosäure 265 bis 272 in drei Unterabschnitte eingeteilt und die Chimären NADL E2 (K₂₆₅vIaMdER₂₇₂), NADL E2 (K₆₅vHaLdTK₂₇₂) und NADL E2 (Q₂₆₅vHaLdER₂₇₂) erzeugt (Abb. 14). Als Ausgangsplasmid für die PCR diente NADL E2 (Alfort 265-272).

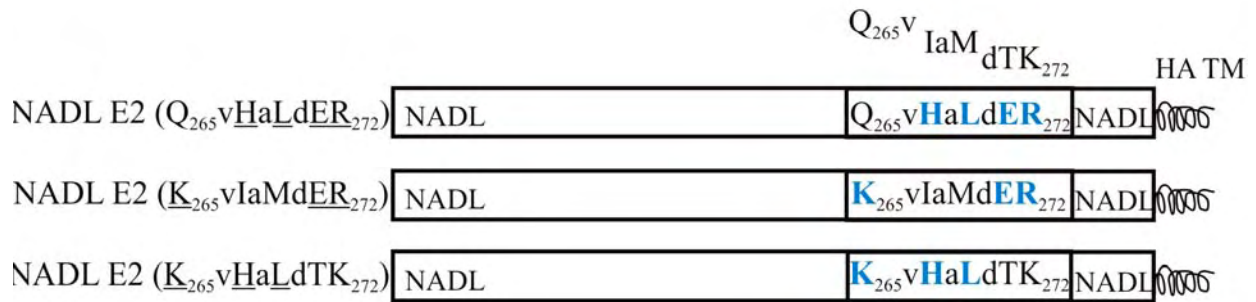


Abb. 15: Schematische Darstellung der NADL/ Alfort E2-Chimären

Der Sequenzabschnitt $Q_{265}vIaMdTK_{272}$ wurde in drei Stufen untersucht. Immer zwei Abschnitte wurden in den verschiedenen Kombinationen durch die analogen Aminosäuren des Alfort E2 ausgetauscht (blau). Die Bezeichnung der Chimären ergibt sich aus ihrem Hauptanteil (NADL E2) und der Aminosäuresequenz innerhalb des Bereiches 265-272. Die Aminosäuren des Alfort E2 sind unterstrichen, zwischen Alfort und NADL E2 konservierte Aminosäuren sind klein geschrieben

Im Zelladsorptionstest konnte nur für das chimäre Protein NADL E2 ($K_{265}vIaMdER_{272}$) die Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen CD46_{bov} beobachtet werden (Tab. 8)

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
NADL E2 ($K_{265}vIaMdER_{272}$)	++	++
NADL E2 ($K_{265}vHaLdTK_{272}$)	-	++
NADL E2 ($Q_{265}vHaLdER_{272}$)	-	++

Tab. 8: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen Nachweises für die E2-Chimären NADL E2 ($K_{265}vIaMdER_{272}$), NADL E2 ($K_{265}vHaLdTK_{272}$) und NADL E2 ($Q_{265}vHaLdER_{272}$)

Alle drei E2-Chimären konnten an der Zelloberfläche mittels des mAKs 65A nachgewiesen werden. Bei der Auswertung des Zelladsorptionstests konnte allerdings nur für NADL E2 ($K_{265}vIaMdER_{272}$) eine Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen detektiert werden.

3.1.5 Untersuchung der CD46_{bov}-Bindung von Alfort/ NADL E2-Chimären

Für die Bestimmung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne im NADL E2 müssen zwei Kriterien in Betracht gezogen werden. Zum einen ist es notwendig, dass ein Verlust der Interaktion zwischen dem viralen Liganden und seinem Rezeptor auftritt, wenn die Bindungsdomäne durch Aminosäuren eines ähnlichen Moleküls ohne Bindungsaktivität an CD46_{bov}, wie z.B. Alfort E2, ersetzt wird. Auf diese Weise war es möglich, die Beteiligung der Aminosäuresequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ an der Rezeptorbindung zu bestimmen. Zum anderen müssen diese Sequenzabschnitte nach Insertion in das Alfort E2 auch zu dessen Bindung an CD46_{bov} führen, um als Bindungsdomäne bezeichnet werden zu können.

Dazu wurden die Nukleinsäuresequenzen, die für die vier identifizierten Peptidsequenzen des NADL E2 kodieren, stufenweise via ortsgerichteter Mutagenese in die Alfort E2-Sequenz eingefügt (Abb. 16). Um jedoch die Gesamtzahl der Cysteine im Alfort E2 nicht zu verändern, wurde bei der Insertion der Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ das Asparagin₅₉ (N) des Alfort E2 beibehalten (Y₅₅LQRNTRET₆₃). Als Ausgangsplasmid für die PCR diente der Vektor pcDNA3 mit der Nukleinsäuresequenz des Alfort E2 sowie der Transmembran- und zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Hämagglutinin (Zhou et al., 1998).

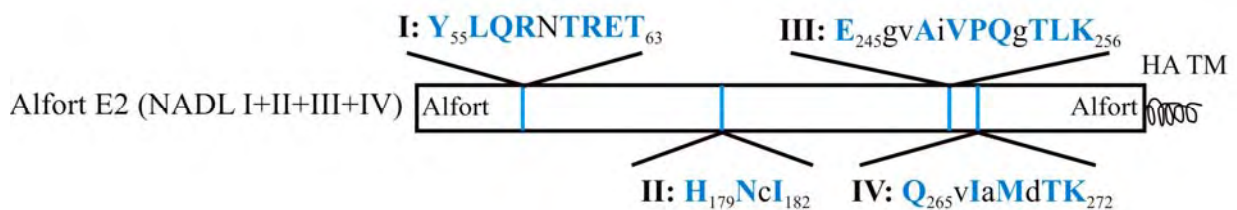


Abb. 16: Schematische Darstellung der Alfort/ NADL E2-Chimären

Das Schema zeigt das Alfort E2 mit der C-terminalen Transmembran- und der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Hämagglutinin (HA TM). Die blauen Balken symbolisieren jeweils eines der vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃ (I), H₁₇₉NcI₁₈₂ (II), E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ (III) und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ (IV) des NADL E2, die nacheinander in das Glykoprotein E2 von Alfort (KSPV)

eingefügt wurden. Die klein geschriebenen Aminosäuren symbolisieren die zwischen NADL und Alfort E2 konservierten Aminosäuren. Die Bezeichnung der neu entstandenen Chimären ergibt sich aus ihrem Hauptanteil (Alfort E2) und der/(n) römische/(n) Ziffer/(n), die stellvertretend für die jeweilige eingesetzte Peptidsequenz des NADL E2 steht (en).

In der Western Blot Analyse verhielten sich die chimären Proteine wie das unveränderte Alfort E2. Das bedeutet, sie waren in der Lage, monomeres und dimeres E2 zu bilden. Nach Insertion der Peptidsequenz Q₂₆₅VlaMdTK₂₇₂ kam es allerdings zu einer Abnahme der Proteinexpression (Abb. 17). Mit Hilfe des immunhistochemischen E2-Nachweises unter Verwendung des mAKs A18 konnte die Abnahme der Expressionsstärke von Alfort E2 (NADL I+III+IV) und Alfort E2 (NADL I+II+III+IV) bestätigt werden (Tab. 9)

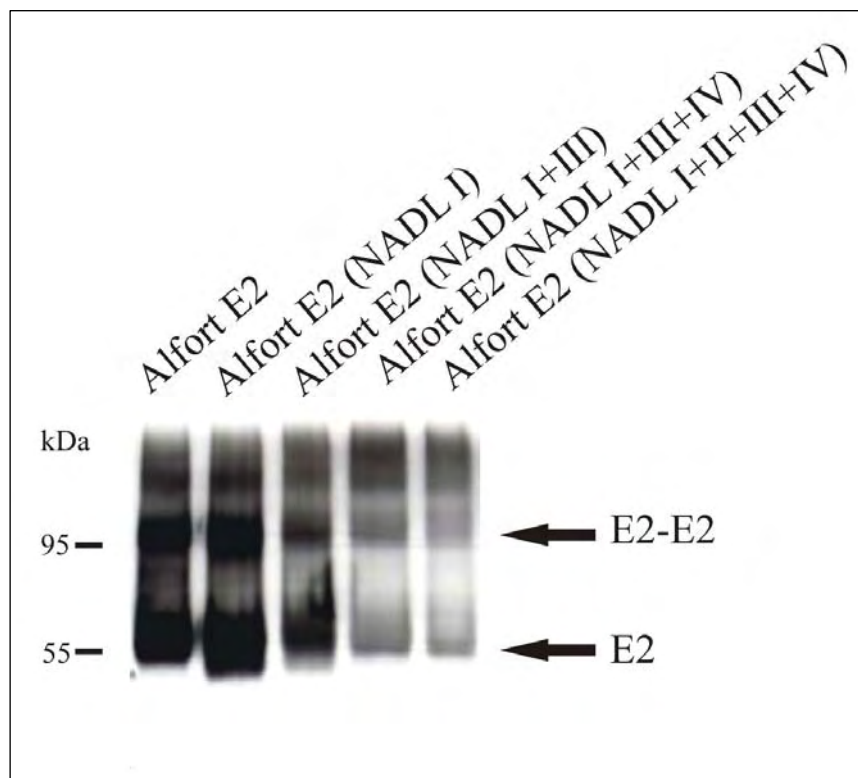


Abb. 17: Western Blot Analyse der Alfort/ NADL E2-Chimären

BHK-Zellen wurden nach der Transfektion mit Alfort E2 (NADL I), Alfort E2 (NADL I+III), Alfort E2 (NADL I+III+IV) bzw. Alfort E2 (NADL I+II+III+IV) im Western Blot unter Verwendung des mAKs A18 untersucht. Entsprechend der Kontrolle bilden die Chimären monomeres und dimeres E2.

Ein Abfall der Expressionsstärke ist nach Insertion der Peptidsequenz Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ (IV) erkennbar. Die Pfeile kennzeichnen das monomere E2 (~55kDa) und das dimere E2 (~110kDa).

Im Zelladsorptionstest war es für keine der E2-Chimären möglich, eine Bindung von fluoreszierenden 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen nachzuweisen (Tab. 9) weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den vier ermittelten Sequenzabschnitten im NADL E2 nicht um die vollständige CD46_{bov}-Bindungsdomäne handelt.

Glykoprotein E2-Konstrukt	Bindung an bovines CD46 (Zelladsorptionstest)	Oberflächenexpression (Immunhistochemie)
Alfort E2 (NADL I)	-	++
Alfort E2 (NADL I+III)	-	++
Alfort E2 (NADL I+III+IV)	-	+
Alfort E2 (NADL I+II+III+IV)	-	+

Tab. 9: Ergebnisse des Zelladsorptionstests und des immunhistochemischen E2-Nachweises der Alfort/ NADL E2-Chimären

Weder das chimäre E2 Protein Alfort E2 (NADL I), noch Alfort E2 (NADL I+III), Alfort E2 (NADL I+III+IV) oder Alfort E2 (NADL I+II+III+IV) waren in der Lage, im Zelladsorptionstest 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen zu binden. Die Oberflächenexpression der Proteine wurde mit dem mAk 65A kontrolliert; dabei fiel auf, dass die Insertion der Peptidsequenz Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ (IV) in das E2 Protein von Alfort zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression führt.

3.2 Etablierung eines quantitativen E2-CD46_{bov}-Bindungstests

Der Zelladsorptionstest mit Calcein-markierten 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen ist ein qualitativer Assay, mit welchem eine E2-CD46_{bov}-Interaktion abgeschätzt werden kann. Die Einstufung der Bindungsstärke wird jedoch aufgrund der unterschiedlichen Stärke der E2-Expression erschwert. Infolgedessen war es kaum möglich, die Relevanz von Aminosäuren im NADL E2 für die Bindung an CD46_{bov} zu bestimmen, wenn sie nicht zu einem Verlust dieser führten. Das Vorhandensein weiterer für die Ligand-Rezeptor-Interaktion notwendiger Bereiche

könnte erklären, weshalb das Alfort E2 nach Insertion der im Zelladsorptionstest identifizierten Sequenzabschnitte Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ keine Bindung an CD46_{bov} aufwies.

3.2.1 Bindungsassay im ELISA-Format mit gereinigtem CD46_{bov}

Wichtige Kriterien bei der Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Quantifizierung der Bindungsaktivität zwischen E2 und bovinem CD46 waren: die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben mit geringem Zeitaufwand, ein möglichst einfacher Versuchsaufbau und eine geringe Anzahl variabler Testkomponenten, die eine inter- und intraexperimentelle Vergleichbarkeit der Daten beeinträchtigen könnten. Aufgrund dessen sollte ein „*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) auf Basis des Zelladsorptionstest entwickelt werden. Bei diesem Verfahren würden die chimären E2 Proteine weiterhin transient in BHK-Zellen überexprimiert werden, allerdings ersetzt man die 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen durch ein lösliches Fusionsprotein bestehend aus bovinem CD46 und dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulins G1 (CD46_{bov}-Fc_{hum}) (Birkmann et al., 2001), wodurch in jedem Experiment der Einsatz einer definierten Menge CD46_{bov} gewährleistet wird. Nach der Inkubation der E2-exprimierenden Zellen mit CD46_{bov}-Fc_{hum} erfolgen mehrere Waschschrte und die Fixierung mit 4%-igem Paraformaldehyd. Aufgrund der Fusion von CD46_{bov} mit Fc_{hum} könnte dessen Bindung an E2 über einen Peroxidase-gekoppelten anti-Human Antikörper (anti-Human-PO) nachgewiesen werden. Das Enzym führt nach der Zugabe von Substrat zu einem Farbumschlag, dessen Intensität mit der Menge an gebundenem CD46_{bov} korreliert. Dieser Farbumschlag ließe sich quantitativ mittels des ELISA Readers über die Messung der OD-Werte bestimmen (Abb. 18).

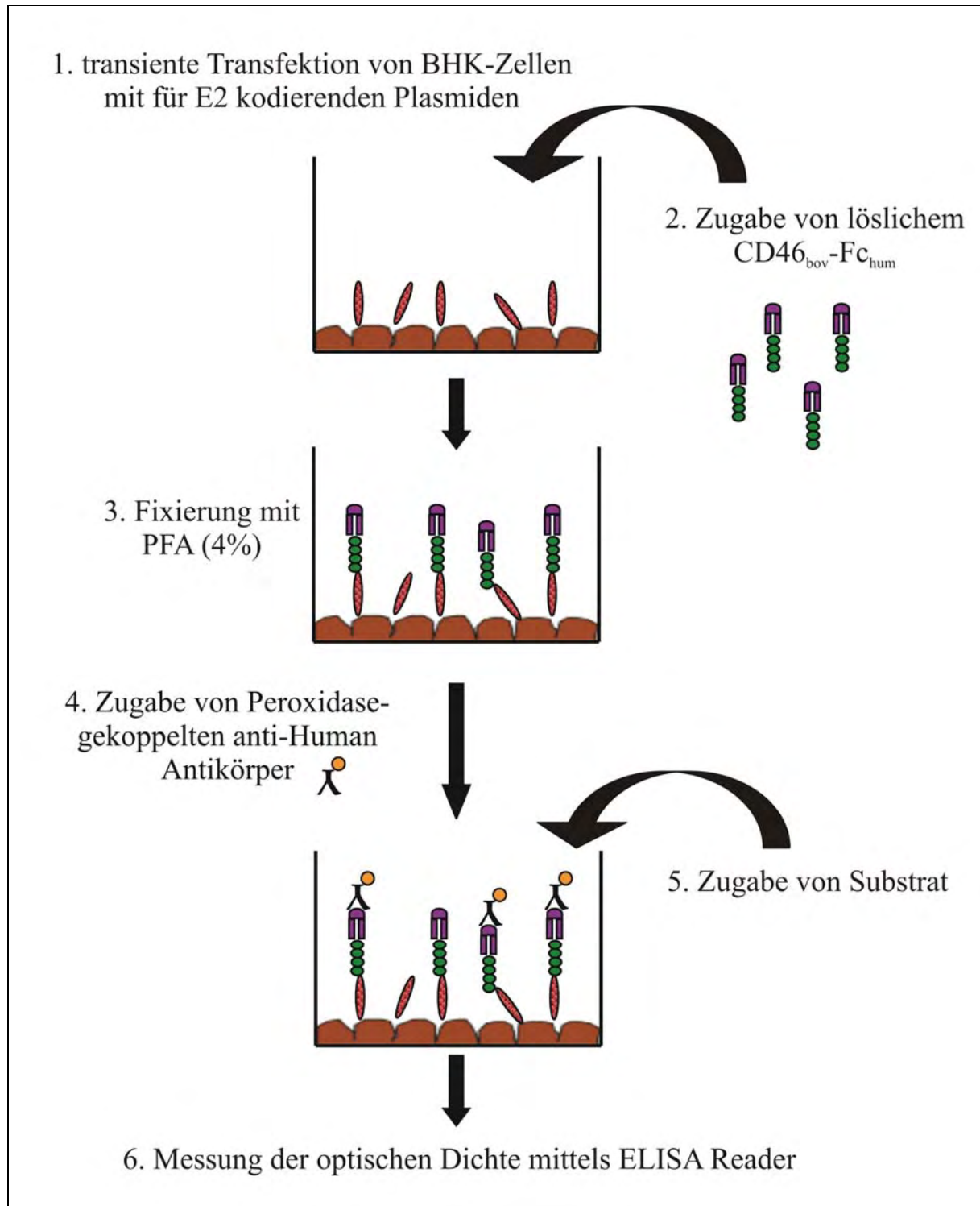


Abb. 18: Schematische Darstellung des Zell-ELISAs

Zunächst werden die chimären E2 Proteine transient in BHK-Zellen überexprimiert. Danach wird lösliches, bovines CD46 auf die Zellen gegeben, welches mit dem Fc-Fragment des humanen

Immunglobulins G1 fusioniert wurde (CD46_{bov}-Fc_{hum}). Im Anschluss daran erfolgen mehrere Waschschrte und die Fixierung der Zellen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA). Schließlich kann mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Human Antikörpers (anti-Human-PO) gebundenes CD46_{bov}-Fc_{hum} detektiert werden. Infolge der Zugabe von Substrat kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität abhängig von der Menge an gebundenem CD46_{bov} ist. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgt mit dem ELISA Reader.

3.2.1.1 Generierung und Reinigung des Fusionsproteins CD46_{bov}-Fc_{hum}

3.2.1.1.1 Klonierung

Bei der Etablierung des ELISAs zur Quantifizierung der CD46_{bov}-Bindung an die chimären E2 Proteine kam dem rekombinanten Protein CD46_{bov}-Fc_{hum} eine besondere Bedeutung zu. Denn nachdem die Menge des löslichen Proteins bestimmt wurde, konnte es in jedem Experiment in konstanten Konzentrationen eingesetzt werden. Bei der Verwendung von zellgebundenem Protein hingegen konnten Veränderungen in der Proteinexpression z.B. infolge von Alterungsprozessen nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte bei Ko-Immunpräzipitationen von CD46_{bov} mit NADL E2 beobachtet werden, dass der anti-CD46-mAK sein Epitop im CD46_{bov} nur noch mit Einschränkungen erkennt, nachdem eine Interaktion mit E2 stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt). Mit der Fusion von CD46_{bov} und Fc_{hum} konnte dieses Problem jedoch umgangen werden, da CD46_{bov} nun indirekt über den Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Human Antikörper nachgewiesen werden konnte. In erster Linie aber diente das humane Fc-Fragment der Aufreinigung von löslichem CD46_{bov} mittels Affinitätschromatographie. Hier eigneten sich, so genannte „*Hi Trap Protein A Säulen*“, da Protein A eine hohe Affinität zur Fc-Region der Immunglobulinen G1 und 2 des Menschen besitzt.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass BVDV E2 nur an den Rezeptor CD46_{bov} binden kann, wenn dessen vollständige extrazelluläre Domäne bestehend aus den vier „*Complement Control Proteins*“ (CCP) vorliegt (Krey et al., 2006a). Deswegen sollte die vollständige extrazelluläre Domäne mit dem N-Terminus des humanen Fc-Fragments fusioniert werden. Dazu wurde zunächst die für die CCPs kodierende Sequenz des bovinen CD46, ausgehend von klonierter DNS, mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe eines

Restriktionsenzym so geschnitten, dass sie in das so genannte Fc-Plasmid ligiert werden konnte, welches sich aus dem Vektor pSecTag2/ HygroB (Invitrogen Inc.) und der für das humane Fc-Fragment des Immunglobulins G1 (IgG1) kodierenden Sequenz zusammensetzt (Birkmann et al., 2001). Anschließend wurde die für das Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} kodierende Sequenz in den Vektor pTre kloniert, um eine regulierbare Expression des rekombinanten Proteins in eukaryotischen Zellen zu ermöglichen.

3.2.1.1.2 Expression

Für die Durchführung des Bindungsassays im ELISA-Format wurde mit einem hohen Bedarf an CD46_{bov}-Fc_{hum} gerechnet, der mit Hilfe einer induzierbaren Tet on Zelllinie gedeckt werden sollte. Das Tet on Expressionssystem erlaubt die Expression eines bestimmten Proteins in eukaryotischen Zellen unter Kontrolle des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transkriptionsaktivator (rtTA) in Anwesenheit von Doxizylin (Gossen et al., 1995). Zur Herstellung einer solchen Zelllinie wurden BHK Tet on Zellen mit einem Plasmid, bestehend aus dem Vektor pTre und der für das CD46_{bov}-Fc_{hum} kodierenden Sequenz (pGRS 27) transfiziert. Als Selektionsmarker wurde das Plasmid pcEF Pac (Rinck et al., 2001) kotransfiziert, welches die Selektion stabil transfizierter Zellen unter Verwendung von Puromycin ermöglichte (2.2.5.1). Zum Nachweis der Expression von CD46_{bov} wurden isolierte Zellklone 24h mit und ohne Zusatz von 5µg/ml Doxizylin im Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für den immunhistochemischen Nachweis mit PFA (4%) fixiert und mit Triton X-100 (0,1%) permeabilisiert. Schließlich erfolgte die Detektion von CD46_{bov} mit anti-CD46_{bov}-mAKs. Auf diese Weise wurde die Zelllinie BHK Tet on pGRS 27 gewonnen. Um das Vorkommen des Fusionsproteins im Zellüberstand sowie seine Identität zu bestätigen, wurden 10µl des Zellkulturmediums der mit Doxizylin induzierten Zellen im Western Blot analysiert. Mit Hilfe der anti-CD46_{bov}-mAKs konnte das Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} als Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 170kDa dargestellt werden. (Abb. 19).

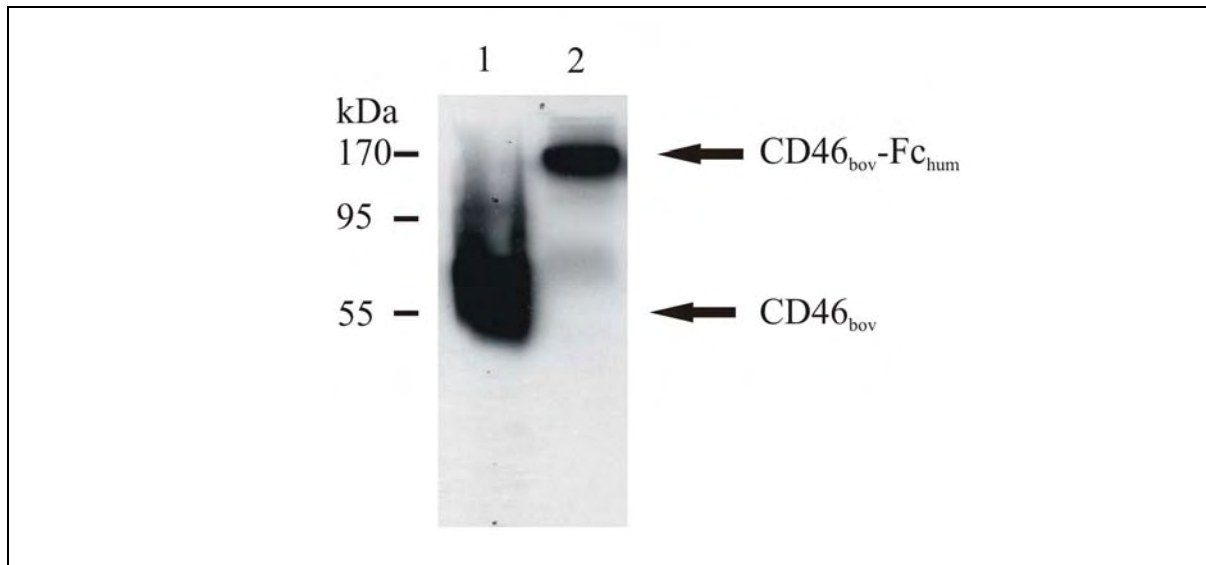


Abb. 19: Western Blot Analyse von CD46_{bov}-Fc_{hum}-haltigem Zellkulturüberstand

10 µl Zellkulturüberstand von induzierten BHK Tet on pGRS 27 wurden mittels Western Blot Analyse auf das Vorkommen von CD46_{bov}-Fc_{hum} untersucht. Spur 1: Als Kontrolle wurde Lysat von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen verwendet. Das bovine CD46 verfügt über ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa. Spur 2: Das Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} stellt sich als Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa dar.

3.2.1.1.3 Affinitätsreinigung von CD46_{bov}-Fc_{hum}

Zur Affinitätsreinigung des Fusionsproteins CD46_{bov}-Fc_{hum} diente eine 1 ml Hi Trap Protein A Chromatographiesäule, die mit je einem Liter vorgeklärtem Zellkulturmedium induzierter, CD46_{bov}-Fc_{hum} exprimierender Zellen beladen wurde. Die Elution des an die Säule gebundenen Proteins erfolgte mit dem „Gentle Ag/ Ab Elution Buffer, pH 6,6“ (Pierce). Die gewonnenen Fraktionen wurden anschließend im ELISA auf das Vorhandensein von CD46_{bov}-Fc_{hum} getestet (2.2.5.3). Alle Fraktionen, die eine OD von 0,3 oder höher aufwiesen, wurden gepoolt und gegen TBS pH 8,0 dialysiert. Zunächst sollte der Erfolg der Reinigung sowie die Identität des Proteins überprüft werden. Deshalb wurden das Ausgangsmaterial, der Durchlauf und das gereinigte Protein unter Verwendung des Ziege-anti-Human-PO Antikörpers im Western Blot analysiert (Abb. 20a). Es ist erkennbar, dass sowohl im gereinigten Material als auch im Durchlauf noch große Mengen des Fusionsproteins enthalten waren. Deshalb wurde eine weitere Reinigung des Durchlaufs unter denselben Bedingungen

wie zuvor vorgenommen. Die Gesamtmenge des Proteins belief sich laut „BC-Mikroassay“ auf Gesamtmengen um etwa 2mg pro Reinigung. Mit Hilfe der Silberfärbung ließ sich ein hoher Reinheitsgrad des Proteins bestimmen (Abb. 20b).

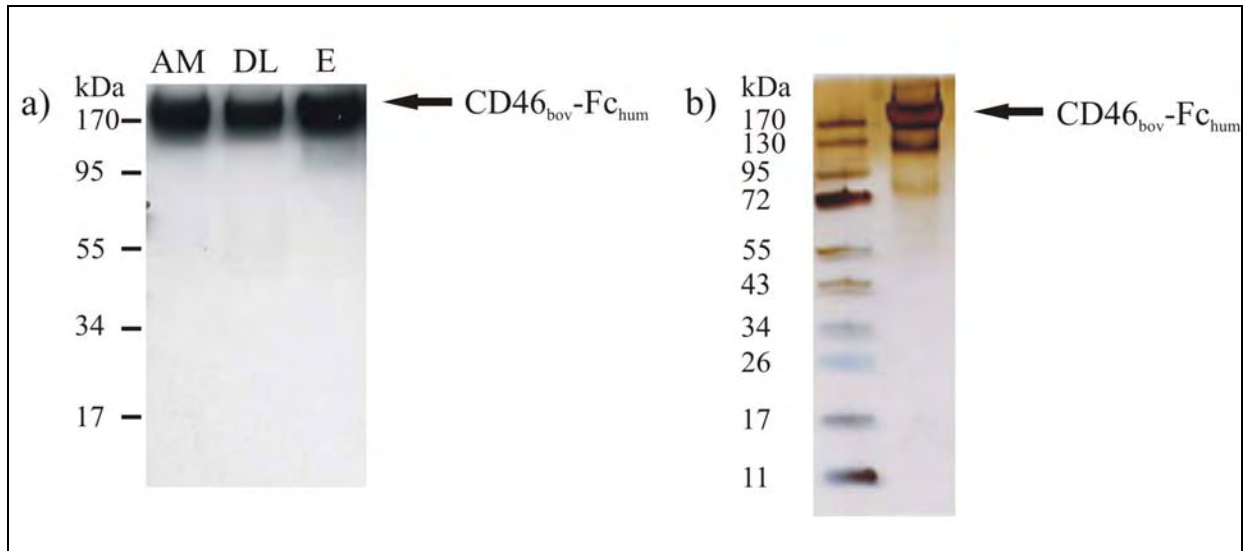


Abb. 20: Ergebnisse der Aufreinigung des Fusionsproteins $CD46_{bov}-Fc_{hum}$

Ein Liter des $CD46_{bov}-Fc_{hum}$ -haltigen Zellkulturmediums wurde mittels einer 1ml Hi Trap Protein A Chromatographiesäule gereinigt. a) Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren wurden das Ausgangsmaterial (AM), der Durchlauf (DL) und die eluierte Fraktion (E) unter Verwendung des Ziege-anti-Human-PO Antikörpers im Western Blot analysiert. Dabei konnten in allen drei Proben große Mengen des Fusionsproteins detektiert werden. b) Der Reinheitsgrad des Proteins wurde mit einer Silberfärbung nach SDS-Page bestimmt. Die Pfeile markieren das Fusionsprotein $CD46_{bov}-Fc_{hum}$.

3.2.1.2 Untersuchung der Funktionalität des löslichen Fusionsproteins $CD46_{bov}-Fc_{hum}$

Nachdem die Identität und Reinheit von $CD46_{bov}-Fc_{hum}$ kontrolliert wurde, sollte im nächsten Schritt die spezifische Bindungsfähigkeit des rekombinanten $CD46_{bov}$ an NADL E2 bestimmt werden. Es sollte außerdem ausgeschlossen werden, dass eine Konformationsänderung des $CD46_{bov}$ infolge der Elution oder der Fusion mit dem Fc-Fragment stattgefunden haben könnte, die sich negativ auf die spezifische Bindung an das Glykoprotein E2 auswirkt.

3.2.1.2.1 Kolokalisierung des CD46_{bov}-Fc_{hum} und des NADL (BVDV) E2 bzw. Alfort (KSPV) E2 mittels konfokaler Lasermikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie können gleichzeitig verschieden markierte Proteine in einer Zelle nachgewiesen und ihre Lokalisierung bestimmt werden. Hierfür wird ein bestimmter Teil der Probe mit dem Anregungslicht eines fokussierten Laserstrahls belichtet, der sich rasch über die verschiedenen Punkte in einer Brennebene der Probe hinweg bewegt. Die von den einzelnen Punkten ausgehenden Signale werden registriert, wodurch ein zusammengesetztes Bild entsteht. Die einzelnen Proteine werden mittels Antikörper detektiert, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Die Anregung dieser Farbstoffe erfolgt durch Licht verschiedener Wellenlänge, so dass sich Kolokalisierungsstellen als Bereiche mit einer veränderten Farbe zeigen, wenn sich die Fluoreszenz beider Farbstoffe überlagert. Ist eines der Proteine mit einem rot und das andere mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert, dann erscheint die Kolokalisierung als gelbes Areal.

Die Kolokalisierung des rekombinanten Proteins CD46_{bov}-Fc_{hum} mit Alfort und NADL E2 würde einen Hinweis auf die spezifische Wechselwirkung zwischen dem Rezeptormolekül und seinem Liganden liefern. Für die Durchführung dieser Untersuchung mussten zunächst wieder BHK-Zellen mit für NADL und Alfort E2 kodierenden Plasmiden transfiziert werden (2.2.1.4). Nach einer einstündigen Inkubation der Zellen mit jeweils 5µg CD46_{bov}-Fc_{hum} und mehreren Waschschritten wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Das Protein CD46_{bov}-Fc_{hum} konnte unmittelbar mit dem Alexa 555-markierten (rot fluoreszierend) anti-Human Antikörper nachgewiesen werden. Für den E2-Nachweis wurden die Zellen zuerst mit dem anti-E2-mAk 65A inkubiert und anschließend mit dem Alexa 488-markierten (grün fluoreszierend) anti-Maus Antikörper.

Die Grünfärbung des E2 trat sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zellinnern auf, was auf die Biosynthese des E2 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat zurückzuführen ist. Bei den NADL E2-exprimierenden Zellen konnte eine Rotfärbung der Zelloberfläche beobachtet werden, die auf eine Bindung von CD46_{bov}-Fc_{hum} hinwies. Die Kolokalisierungsstellen der beiden Proteine stellten sich als gelbe Signale dar. Wie erwartet

konnte für Alfort E2 keine Bindung von $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} nachgewiesen werden und infolgedessen auch keine Kolokalisierung (Abb. 21).

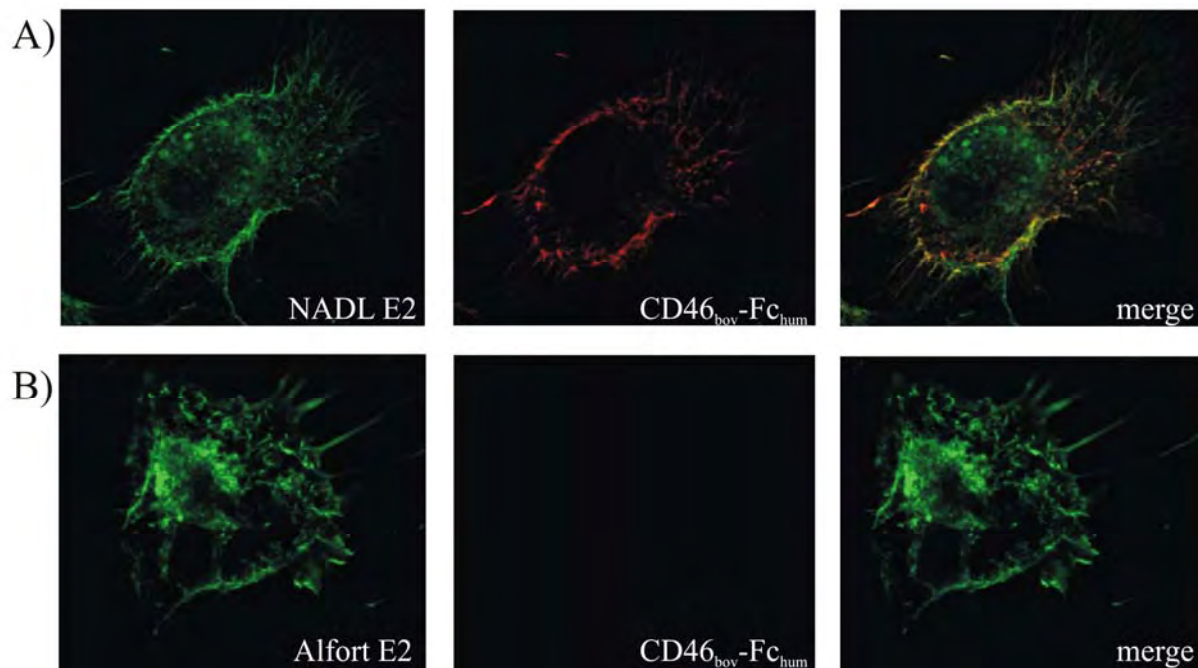


Abb. 21: Kolokalisierung des Glykoproteins E2 mit $CD46_{bov}$ -Fc_{hum}

NADL und Alfort E2-exprimierende BHK-Zellen wurden mit $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} inkubiert, anschließend gewaschen und fixiert. Das $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} wurde unmittelbar mit dem Alexa 555-markierten (rot fluoreszierend) anti-Human Antikörper nachgewiesen, während der E2-Nachweis über den anti-E2-mAk 65A und den Alexa 488-markierten (grün fluoreszierend) anti-Maus Antikörper erfolgte. Die Glykoproteine NADL und Alfort E2 konnten sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zellinnern nachgewiesen werden. A) Die Rotfärbung an der Zelloberfläche von NADL E2-exprimierenden Zellen bedeutet, dass eine Bindung von $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} stattgefunden hat. Als gelbe Signale stellten sich die Kolokalisierungsstellen der beiden Proteine dar. B) Für Alfort E2 konnte keine Kolokalisierung nachgewiesen werden.

3.2.1.2.2 Anwendung des $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} im ELISA auf NADL bzw. Alfort E2-exprimierenden Zellen

Für die geplante Anwendung des Fusionsproteins $CD46_{bov}$ -Fc_{hum} sollte seine Funktionalität im Zell-ELISA geprüft werden. Damit einher ging auch die Optimierung der Bedingungen, unter denen der ELISA durchgeführt werden sollte. Unter anderem musste die optimale

Konzentration an CD46_{bov}-Fc_{hum} bestimmt werden, bei welcher sich die OD-Werte der für NADL E2- und Alfort E2-exprimierenden Zellen bzw. nicht transfizierten BHK-Zellen am stärksten unterschieden. Die mindestens einzusetzende Menge an CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde dabei auf 5 µg/ Vertiefung einer 96 „well“ Platte festgelegt. Des Weiteren war es von besonderer Bedeutung, die Waschschrte im Anschluss an die Inkubation mit CD46_{bov}-Fc_{hum} so zu optimieren, dass unspezifisch gebundenes CD46_{bov}-Fc_{hum} entfernt werden konnte, ohne die nicht fixierten Zellen dabei abzulösen.

Nachdem die Bedingungen für den ELISA standardisiert waren, konnte der Bindungsassay auf transient Alfort und NADL E2-exprimierenden Zellen durchgeführt werden (2.2.6). Die Oberflächenexpression der E2 Proteine von Alfort und NADL wurde ebenfalls im ELISA bestimmt. Dazu wurden die transfizierten Zellen fixiert und zunächst mit dem mAk 65A und anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PO Antikörper inkubiert (2.2.1.7.2).

Da kein großer Unterschied in der Oberflächenexpression der beiden Proteine zu erkennen war, konnten die Ergebnisse des Bindungsassays miteinander verglichen werden. Für Alfort E2-exprimierende Zellen, die mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert wurden, konnte eine OD von ca. 0,1 gemessen werden. Dieselben OD-Werte ermittelte man für E2-exprimierende Zellen, die nicht mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert wurden. Hingegen lagen die OD-Werte für NADL E2-exprimierende Zellen, welche mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert wurden, einen Faktor 2,5-4 höher (Abb. 22). Daraufhin wurde der mit NADL E2 erreichte OD-Wert als oberer Schwellenwert des ELISAs festgelegt, bei dem die Bindung von E2 an CD46_{bov} als 100% bezeichnet wird. In entsprechender Weise wurde der mit Alfort E2 erzielte OD-Wert als der untere Schwellenwert („cut off“) festgesetzt, bei dem die Bindung an CD46_{bov} als negativ zu bewerten ist.

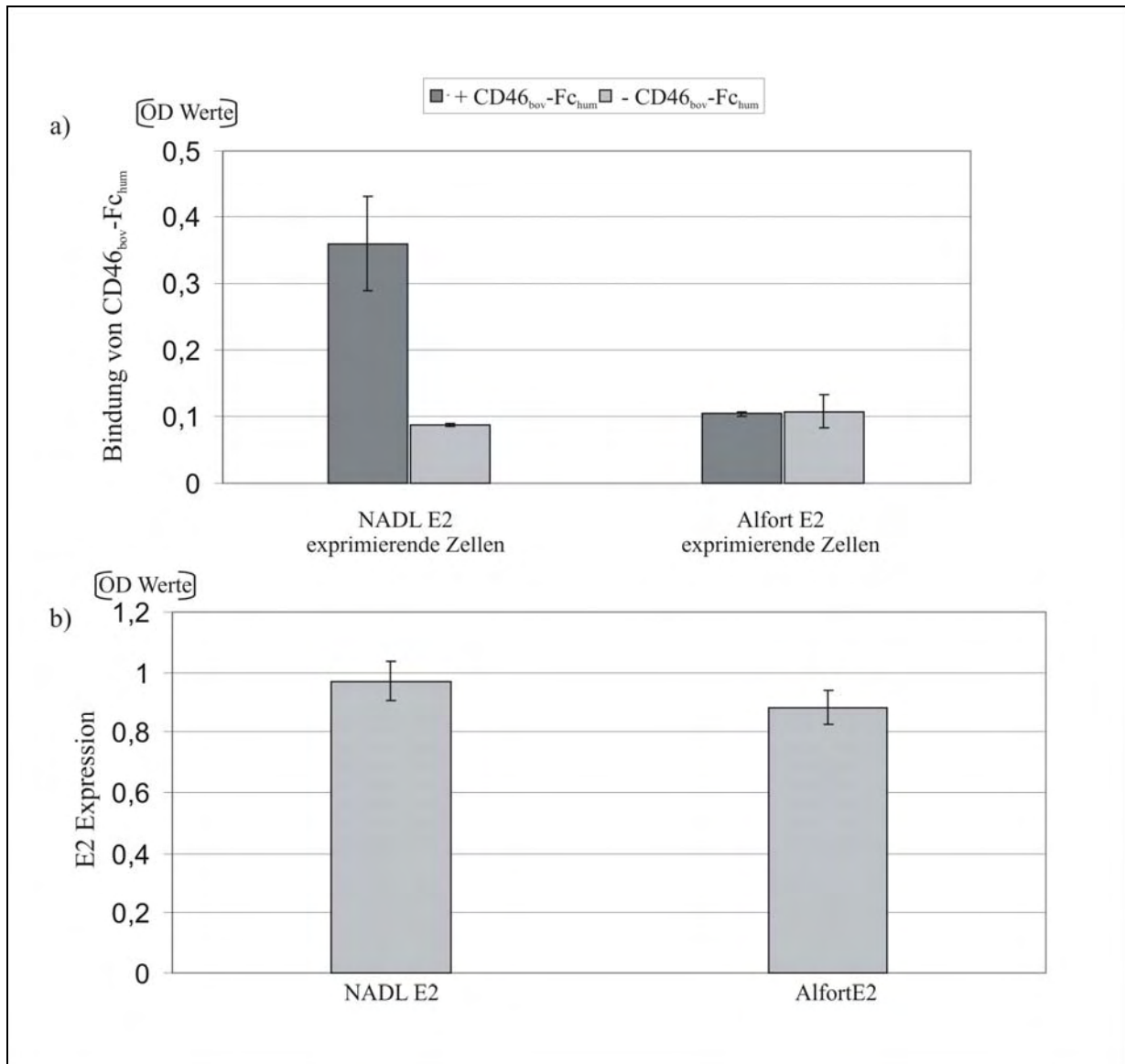


Abb. 22: Ergebnisse des Zell-ELISAs mit E2-exprimierenden Zellen und CD46_{bov}-Fc_{hum}

a) Während sich für NADL E2-exprimierende Zellen, welche mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert worden waren, OD-Werte zwischen 0,3 und 0,4 ergaben, konnte für Alfort E2-exprimierende Zellen, die mit CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert wurden, eine OD von ca. 0,1 ermittelt werden. Erfolgte keine Inkubation der E2-exprimierenden Zellen mit CD46_{bov}-Fc_{hum} wurde im Zell-ELISA ebenfalls eine OD von ca. 0,1 gemessen. b) Die mittels des mAKs 65A bestimmte Oberflächenexpression der beiden E2 Proteine war nur geringfügig unterschiedlich. Die Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt, wobei im Diagramm die Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben sind.

3.2.1.2.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Fusionsproteins im ELISA unter Verwendung von löslichem NADL E2

Zur weiteren Charakterisierung des rekombinanten Proteins CD46_{bov}-Fc_{hum} sollte überprüft werden, ob es sich in seiner Fähigkeit, an NADL E2 zu binden, durch Antikörper gegen CD46_{bov} hemmen lässt. Für dieses Experiment sollte anstelle von NADL E2-überexprimierenden Zellen lösliches, in Insektenzellen exprimiertes NADL E2 verwendet werden (bereitgestellt von T. Krey). Zuerst musste jedoch geklärt werden, ob CD46_{bov}-Fc_{hum} überhaupt in der Lage ist, an gereinigtes, lösliches E2 zu binden. Dazu wurden Elisa-Platten mit dem E2 Protein von BVDV (NADL) beschichtet (200ng/ Vertiefung) und mit BSA (1%) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit CD46_{bov}-Fc_{hum} und der Nachweis der Bindung an E2, wie bereits für den Zell-ELISA beschrieben (2.2.6). Die ermittelten OD-Werte lagen zwischen 0,2 und 0,3, ähnlich denen im Zell-ELISA und waren ca. einen Faktor 10 höher als die der Negativkontrolle. Beim parallel durchgeführten Nachweis des löslichen NADL E2 (2.2.4.6) unter Verwendung des mAKs 65A ergaben sich OD-Werte zwischen 1,2 und 1,8. Diese lagen etwa einen Faktor 1,5 bis 2 über den OD-Werten, die für NADL E2-exprimierende Zellen ermittelt wurden. Nachdem in Vorversuchen festgestellt wurde, dass die zur Hemmung der CD46_{bov}-Bindung eingesetzten Antikörper das CD46_{bov}-Fc_{hum} erkennen können, wurde damit begonnen, deren Einfluss auf die Bindung des Fusionsproteins an NADL E2 zu untersuchen. Hierzu wurden jeweils 5µg CD46_{bov}-Fc_{hum} mit 10 bzw. 15µg der gereinigten Antikörper BVD/ Ca 17 bzw. 26 bei Raumtemperatur präinkubiert. Der Einsatz einer größeren Menge Antikörper sollte das Vorkommen freier Antikörperbindungsstellen im CD46_{bov} vermeiden. Schließlich wurden die Präzipitate auf die mit NADL E2 beschichteten ELISA-Platten gegeben. Nach einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Platten mehrmals gewaschen und der Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Human Antikörper zugegeben, um gebundenes CD46_{bov}-Fc_{hum} detektieren zu können. Die Ergebnisse der Messung der optischen Dichte zeigen, dass die Bindung von CD46_{bov}-Fc_{hum} an NADL E2 mit Hilfe von anti-CD46_{bov}-Antikörpern zwar gehemmt werden konnte, jedoch wurden große Mengen an Antikörper dafür benötigt. Die Verwendung von unverdünntem Überstand, bestehend aus gleichen Teilen an BVD/ Ca 17, 26 und 27, führte zur stärksten Hemmung der Interaktion zwischen NADL E2 und CD46_{bov}-Fc_{hum} (Abb. 23).

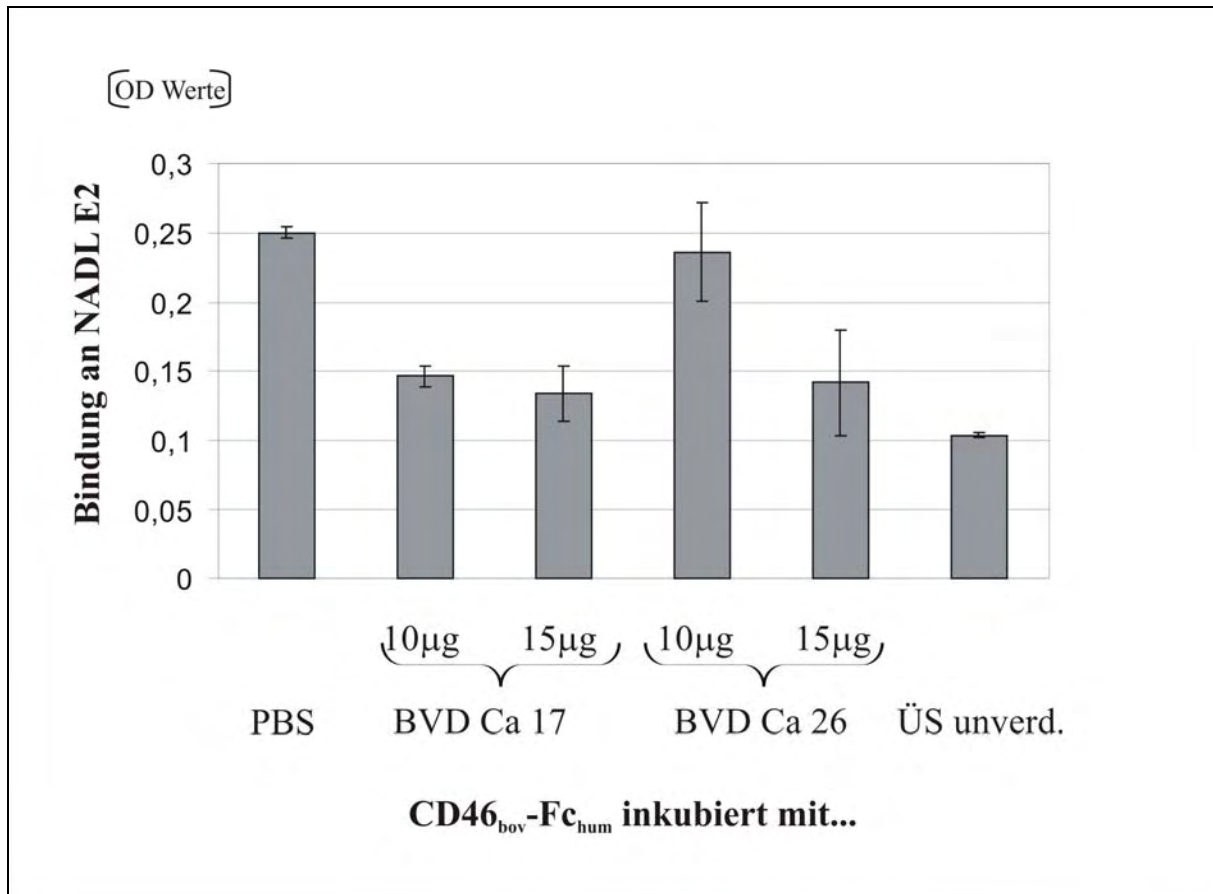


Abb. 23: Einfluss der anti-CD46_{bov}-mAbs auf die Bindung von CD46_{bov}-Fc_{hum} an NADL E2

Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit 200ng löslichem NADL E2 beschichtet. Nach der Blockierung wurden 5µg CD46_{bov}-Fc_{hum} hinzugegeben, die mit PBS, gereinigten BVD/ Ca 17 bzw. 26 oder unverdünntem Überstand aus BVD/ Ca 17, 26 und 27 (ÜS unverd.) präinkubiert wurden. Wurde CD46_{bov}-Fc_{hum} mit PBS präinkubiert, so erreichte man OD-Werte, die zwischen 0,2 und 0,3 lagen. Allerdings ließ sich nach der Präinkubation mit anti-CD46_{bov}-Antikörpern eine von der Art und Menge des eingesetzten Antikörpers abhängige Hemmung der Bindung nachweisen. Der stärkste hemmende Effekt auf die Bindung von CD46_{bov}-Fc_{hum} an NADL E2 wurde mit unverdünntem Überstand erzielt, der geringste Effekt mit 10µg BVD/ Ca 26. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt, im Diagramm sind die Mittelwerte und die sich ergebenden Standardabweichungen dargestellt.

3.2.1.2.4 Analyse des Einflusses von CD46_{bov}-Fc_{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen mit KSPV-Stamm Alfort und BVDV-Stamm NADL

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass die Infektionseffizienz verschiedener BVDV-Stämme durch eine Präinkubation der Wirtszelle (MDBK) mit gegen CD46_{bov} gerichteten, monoklonalen Antikörpern reduziert werden kann, wohingegen die Infektion mit KSPV davon unbeeinträchtigt bleibt (Schelp et al., 1995; Maurer 2002). Mit der Untersuchung des Einflusses des Fusionsproteins CD46_{bov}-Fc_{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen mit KSPV und BVDV sollte seine Charakterisierung abgeschlossen werden. Hierzu wurden die hemmenden Effekte von drei verschiedenen Mengen des Proteins CD46_{bov}-Fc_{hum} auf die Infektion mit KSPV Alfort (rKSPV) und BVDV NADL miteinander verglichen.

Nach Präinkubation der Viren mit PBS, 1, 5 und 10 µg CD46_{bov}-Fc_{hum} wurden MDBK-Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.9.1 beschrieben, infiziert. Die erfolgreiche Virusinfektion wurde mit dem mAK Code4 immunhistochemisch nachgewiesen, da dieser sowohl das NS3 Protein von KSPV-Stamm Alfort als auch von BVDV-Stamm NADL detektieren kann. Für die Auswertung wurden „*plaques*“ ausgezählt und die Infektionseffizienz errechnet, indem für Virus, welches nicht mit CD46_{bov}-Fc_{hum} präinkubiert wurde, die „*plaque*“ Anzahl auf MDBK-Zellen als 100% angenommen wurde. Die „*plaque*“ Anzahl der mit den verschiedenen Mengen an CD46_{bov}-Fc_{hum} präinkubierten Zellen konnte dann in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, angegeben werden.

Wie erwartet ließ sich rKSPV durch CD46_{bov}-Fc_{hum} nicht in seiner Infektiosität hemmen. Allerdings wurde für BVDV NADL eine Reduktion der Infektionseffizienz auf 65% beobachtet, die sich durch Zugabe größerer Mengen an CD46_{bov}-Fc_{hum} auf bis zu 13% steigern ließ. Die vollständige Aufhebung der Infektiosität wurde jedoch nicht erreicht. (Abb. 24).

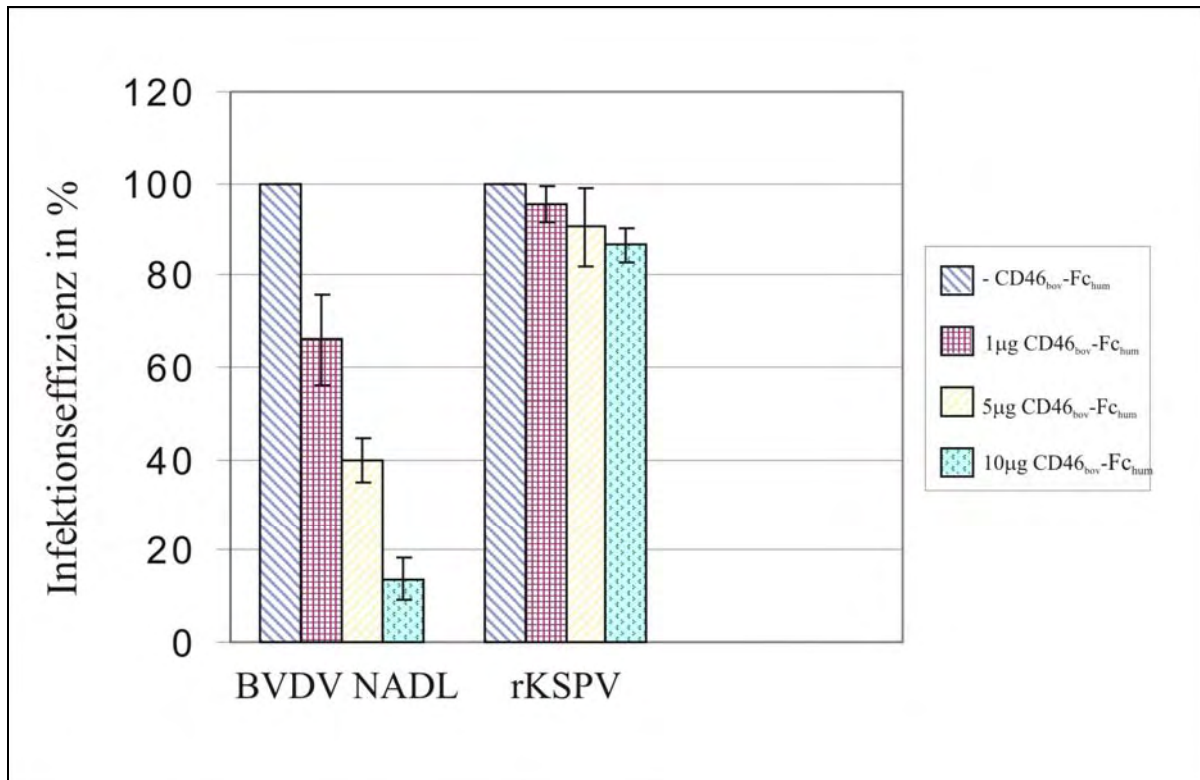


Abb. 24: Einfluss von CD46_{bov}-Fc_{hum} auf die Infektion von MDBK-Zellen mit rKSPV und BVDV-Stamm NADL

10^2 TCID₅₀ an BVDV NADL und rekombinantem KSPV Alfort (rKSPV) wurden vor der Infektion von MDBK-Zellen mit PBS, 1, 5 bzw. 10 µg CD46_{bov}-Fc_{hum} inkubiert. Während sich rKSPV dadurch nicht in seiner Infektiosität hemmen ließ, wurde für BVDV NADL eine Reduktion der Infektionseffizienz beobachtet. Obwohl dieser Effekt bei BVDV NADL durch Zugabe größerer Mengen CD46_{bov}-Fc_{hum} gesteigert werden konnte, wurde eine vollständige Aufhebung der Infektiosität nicht erreicht. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt, die Prozentzahlen wurden entsprechend der Angaben in Kapitel 2.2.1.9.1 errechnet. Im Diagramm sind die Mittelwerte und die sich ergebenden Standardabweichungen dargestellt.

3.3 Bestimmung der Bindungsaktivität zwischen CD46_{bov} und den NADL/ Alfort E2-Chimären im Zell-ELISA

Verschiedene Untersuchungen hatten gezeigt, dass das rekombinante Protein CD46_{bov}-Fc_{hum} in der Lage ist, spezifisch an das Glykoprotein E2 des BVDV-Stammes NADL zu binden. Dies ermöglichte es, einen Zell-ELISA zu etablieren (3.2.1.2.2), um die Bindungsaktivität zwischen CD46_{bov} und den diversen, hier beschriebenen E2-Chimären quantitativ zu

bestimmen. Damit die Ergebnisse des ELISAs untereinander vergleichbar waren, mussten verschiedene Faktoren beachtet werden. Zum einen sollte die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion soweit möglich immer dieselbe sein. Zum anderen wurden NADL E2- und Alfort E2-exprimierende Zellen immer als Kontrollen mitgeführt. Dadurch konnten zwischen den einzelnen Experimenten auftretende Abweichungen der OD-Werte, z.B. infolge technischer Probleme oder Veränderungen im Zellstoffwechsel, ausgeglichen werden.

Zur Standardisierung wurde auch die Oberflächenexpression der chimären E2 Proteine unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 65A bestimmt (2.2.1.7.2). Von den getesteten Antikörpern (siehe 3.1.2) war er als einziger in der Lage, alle chimären E2 Proteine zu detektieren. Die für die NADL E2-Expression ermittelten OD-Werte wurden dabei als oberer Schwellenwert festgesetzt, bei dem die E2-Expression 100% beträgt.

In die Berechnung der CD46_{bov}-Bindungsaktivität der verschiedenen E2 Proteine sollten die gemessenen Unterschiede in der Oberflächenexpression mit einfließen, um die CD46_{bov}-Bindungsaktivität entsprechend korrigieren zu können (CD46-Bind._{korrr}). E2-Chimären mit einer stark reduzierten Oberflächenexpression (OD <0,5) wurden bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Jede E2-Chimäre wurde im Duplikat in zwei voneinander unabhängigen ELISAs auf ihre CD46_{bov}-Bindungsaktivität getestet. Aus den vier resultierenden OD-Werten wurde dann der Mittelwert bestimmt (OD_{CD46}), welcher gemeinsam mit dem Mittelwert aus den für die E2-Expression ermittelten OD-Werten (OD_{E2}) in die Formel

$$(OD_{E2} \text{ NADL} : OD_{E2} \text{ Chimäre}) \times OD_{CD46} \text{ Chimäre} = CD46 \text{ Bind-}_{korrr} \text{ Chimäre}$$

einfluss. Die korrigierte CD46_{bov}-Bindungsaktivität der Negativkontrolle Alfort E2 wurde, wie für die chimären E2 Proteine, ermittelt. Im nächsten Schritt wurde die Differenz aus der korrigierten CD46_{bov}-Bindungsaktivität von NADL E2 bzw. des chimären E2 Proteins und von Alfort E2 (unterer Schwellenwert des ELISAs) errechnet. Die so korrigierten absoluten Werte wurden abschließend in Prozent angegeben, um die Ergebnisse des Zell-ELISAs besser in Beziehung zueinander setzen zu können. Hierfür wurde jeweils die CD46_{bov}-Bindungsaktivität des NADL E2 als 100% angenommen und die der chimären E2 Proteine in Prozent der Kontrolle angegeben.

Im Zell-ELISA ließen sich die mit dem Zelladsorptionstest getroffenen Aussagen über die CD46_{bov}-Bindungsaktivität der einzelnen NADL/ Alfort E2-Chimären bestätigen, wobei bei den positiv bewerteten E2-Chimären deutliche Unterschiede in der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auffielen. Für die Chimären NADL E2 (Alfort 211-217) und NADL E2 (Alfort 59/ 104) ergaben sich CD46_{bov} Bindungsaktivitäten von über 100%. Die Insertion der potentiellen N-Glykosylierungsstelle an Position 122 (NADL E2 (Alfort 124-127)) führte zu einer mäßig reduzierten Bindung an CD46_{bov} von ca. 76%, wohingegen die Insertion der potentiellen N-Glykosylierungsstelle an Position 261 (NADL E2 (Alfort 258-261)) eine nicht nennenswerte Reduktion der CD46_{bov}-Bindung auf 97% bewirkt.

Eine besonders starke Abnahme der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf <35% wurde für die Chimären NADL E2 (Alfort 79-92), NADL E2 (Alfort 191-196), NADL E2 (Alfort 201-206) und NADL E2 (Alfort 236-241) nachgewiesen. Die Chimären NADL E2 (Alfort 55-63/C59) und NADL E2 (Alfort 87-92) konnten aufgrund ihrer stark reduzierten Oberflächenexpression (OD <0,2) nicht ausgewertet werden. Die Chimären NADL E2 (Alfort 179-182), NADL E2 (Alfort 245-256) und NADL E2 (Alfort 265-272) wiesen keine Bindung an CD46_{bov} auf (Abb. 25).

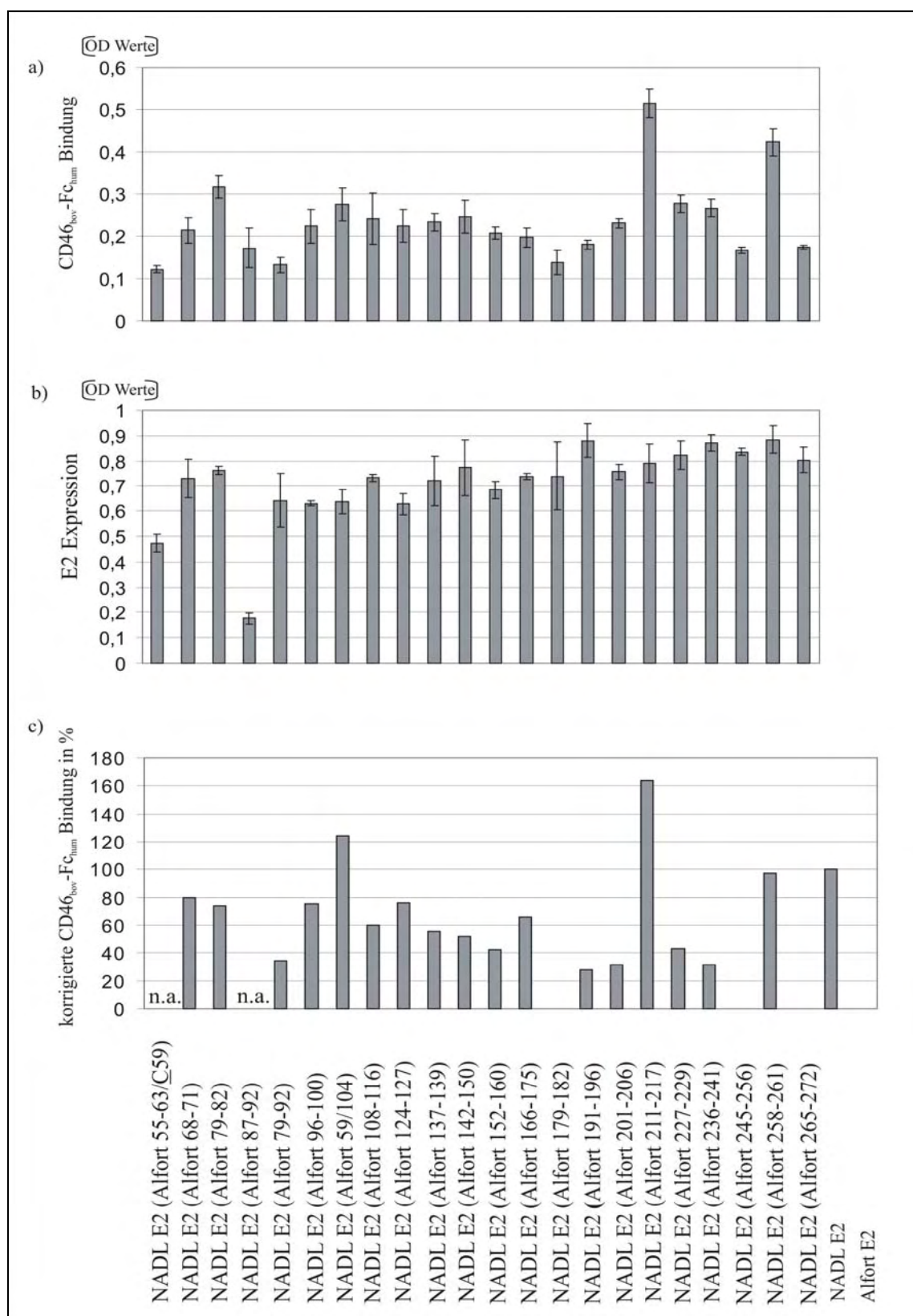


Abb. 25: Ergebnisse des Zell-ELISAs für die NADL/ Alfort E2-Chimären aus Kapitel 3.1.3

a) Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen, die sich aus den OD-Werten zweier Experimente zusammensetzen, in denen die E2-Chimären jeweils im Duplikat auf ihre Bindung an CD46_{bov}-Fc_{hum} getestet wurden. b) Parallel wurde die Oberflächenexpression der E2 Proteine quantifiziert (dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen), welche c) in die Berechnung der prozentualen CD46_{bov}-Bindungsaktivität mit einfluss. Die korrigierte Bindungsaktivität jeder NADL/ Alfort E2-Chimäre wurde in % der Kontrolle NADL E2 angegeben, deren Bindungsaktivität auf 100% festgelegt wurde. E2-Chimären mit einer stark reduzierten Oberflächenexpression (OD <0,5) wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (n.a).

Ebenso im Zell-ELISA getestet wurden die NADL/ Alfort E2-Chimären, welche hergestellt wurden, um den Einfluss der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ auf die CD46_{bov}-Bindung zu klären. Dabei ließen sich zum einen die Ergebnisse des Zell-ELISAs bestätigen, aber darüber hinaus konnte auch der Einfluss der einzelnen Aminosäuren bzw. Sequenzabschnitte auf die Bindung an CD46_{bov} quantitativ bestimmt werden.

Für die Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ wurde gezeigt, dass der Austausch gegen V₅₅TALCVVET₆₃ zu einer mäßigen Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf etwa 86% führt, wohingegen mit den Chimären NADL E2 (V₅₅TQRCVVSR₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCTRSR₆₃) eine 40-50%-ige Bindung von CD46_{bov}-Fc_{hum} erzielt wurde. Bei der näheren Untersuchung der Aminosäuren Glutaminsäure62 (E) und Threonin63 (T) konnte beobachtet werden, dass sich die CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 56% reduzierte, wenn man den Sequenzabschnitt Y₅₅LQRCTRET₆₃ bis auf Cystein59 (C) und Glutaminsäure62 gegen V₅₅TALCVVER₆₃ (NADL E2 (V₅₅TALCVVER₆₃)) ersetzte. Eine Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 37% tritt auf, sobald von der Originalsequenz nur noch Cystein59 und Threonin63 (NADL E2 (V₅₅TALCVVST₆₃)) vorhanden waren.

Aufgrund der verminderten Expression der E2-Chimäre NADL E2 (Y₅₅LALCVVSR₆₃) an der Zelloberfläche wurde nach einer geeigneten Alternative gesucht, um die Bedeutung von Tyrosin55 (Y) und Leucin56 (L) für die CD46_{bov}-Bindung im Zell-ELISA überprüfen zu können. Es wurde deshalb auf das Plasmid pE2_(p1-56/b57-294/p294-396) (Himmelreich 2003)

zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um eine NADL/ Alfort E2-Chimäre, welche die für die CD46_{bov}-Bindung benötigte „*Minimalsequenz*“ (Aminosäure 57-293) des NADL E2 enthält. Dieses chimäre Protein wies eine CD46_{bov}-Bindungsaktivität von ca. 104% auf.

Der Austausch der Aminosäuren Histidin179 (H) und Asparagin180 (N) innerhalb des Oligopeptides H₁₇₉NcI₁₈₂ (NADL E2 (E₁₇₉HcI₁₈₂)) führte zu einem vollständigen Verlust der CD46_{bov}-Bindung, während der Austausch des Isoleucin182 (I) gegen Lysin (K) (NADL E2 (H₁₇₉NcK₁₈₂)) eine Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 46% bewirkte.

Für das Oligopeptid E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ konnte beobachtet werden, dass nach Austausch der Glutaminsäure245 (E) durch Asparaginsäure (D) die CD46_{bov}-Bindungsaktivität von NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) bei ca. 60% liegt. Sie betrug noch etwa 40% für NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLE₂₅₆), nachdem zusätzlich das Lysin256 (K) gegen Glutaminsäure (E) ersetzt wurde. Die im Zelladsorptionstest negativ getesteten E2-Chimären NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆) und NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆) wiesen im Zell-ELISA eine Bindung von 4% an CD46_{bov} auf.

Tauschte man die Sequenz Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ im NADL E2 gegen K₂₆₅vIaMdER₂₇₂ (NADL E2 (K₂₆₅vIaMdER₂₇₂)) blieb im Zelladsorptionstest die Bindung von 38A₁D-CD46_{bov}-Zellen erhalten. Die CD46_{bov}-Aktivität betrug allerdings laut Zell-ELISA nur ca. 27%. Wurden jedoch Isoleucin276 (I) und Methionin (M) ausgetauscht (NADL E2 (K₂₆₅vHaLdTK₂₇₂)) und NADL E2 (Q₂₆₅vHaLdER₂₇₂)), so fand keine Bindung an bovines CD46 statt (Abb. 26).

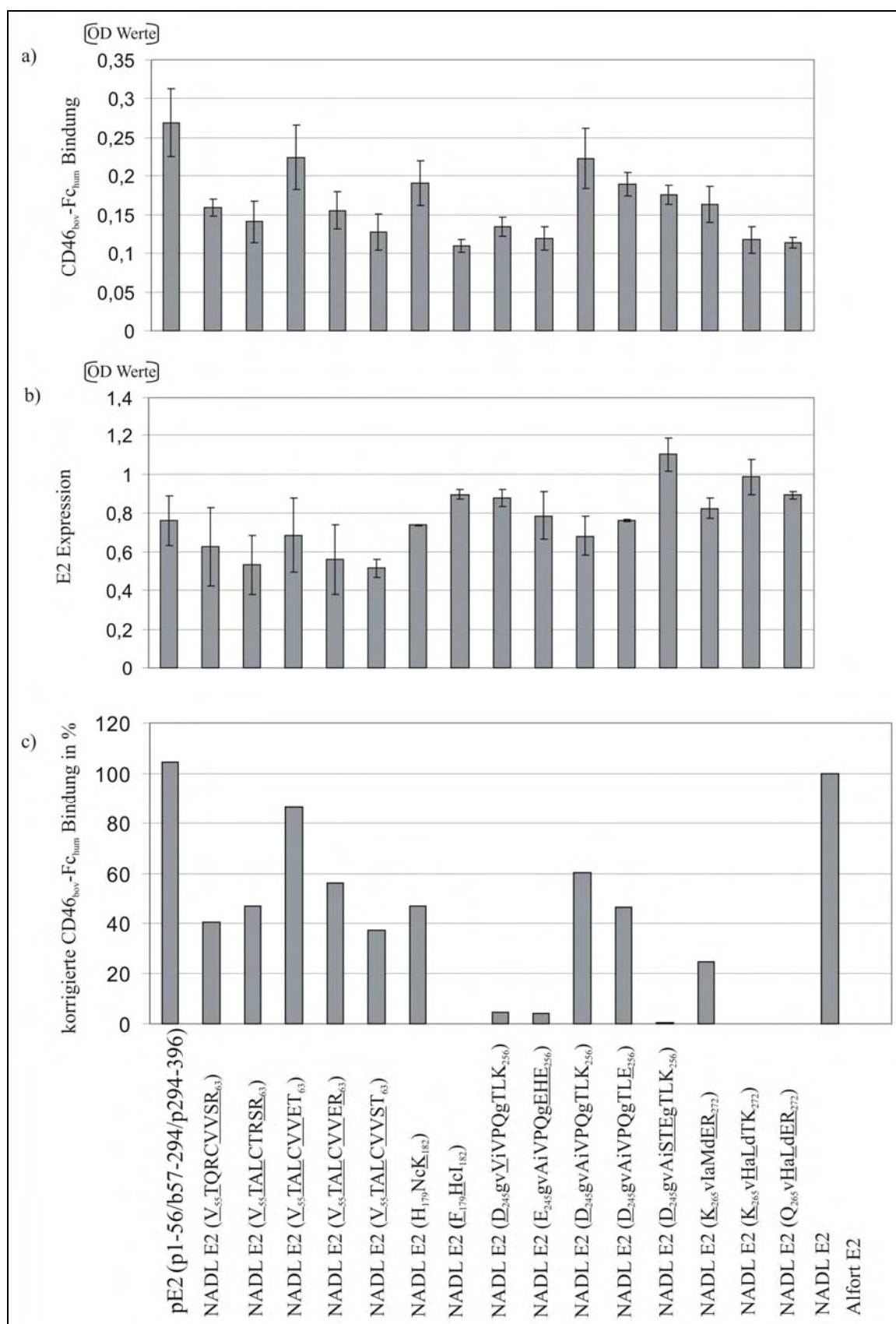


Abb. 26: Ergebnisse des Zell-ELISAs für die NADL/ Alfort E2-Chimären aus Kapitel 3.1.4

a) Gezeigt werden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen, die sich aus den OD-Werten zweier Experimente zusammensetzen, in denen die E2-Chimären jeweils im Duplikat auf ihre Bindung an CD46 getestet wurden. b) Die Expression der E2 Proteine an der Zelloberfläche wurde parallel ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus den zwei Experimenten sowie die Standardabweichung. c) Die korrigierte Bindungsaktivität jeder NADL/ Alfort E2-Chimäre ist in Prozent der Kontrolle NADL E2 angegeben, deren Bindungsaktivität auf 100% festgelegt wurde.

Nicht ausgewertet wurden die Alfort/ NADL E2-Chimären, da sie keine ausreichende Oberflächenexpression aufwiesen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne im Glykoprotein E2 von NADL

In dieser Arbeit sollten die für die Interaktion mit CD46_{bov} essentiellen Aminosäuren innerhalb des Glykoproteins E2 des BVDV-Stammes NADL identifiziert werden. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Unterschied in der Nutzung des zellulären Rezeptors CD46_{bov} durch die Pestivirusspezies BVDV und KSPV besteht (Maurer et al., 2004). Anders als für NADL (BVDV) E2 konnte für Alfort (KSPV) E2 keine Interaktion mit CD46_{bov} detektiert werden (Himmelreich, Diss. 2003). Dies ermöglichte es, den für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Sequenzabschnitt mit Hilfe von NADL/ Alfort E2-Chimären zunächst auf die Aminosäuren 29 bis 293 einzugrenzen (Himmelreich, Diss. 2003). Aufbauend auf diesen Daten wurden systematisch weitere NADL/ Alfort E2-Chimären hergestellt (Abb. 4) und deren Bindung an CD46_{bov} im Zelladsorptionstest überprüft. Nachdem der Austausch der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ im NADL E2 gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 zu einem Verlust der Bindung an CD46_{bov} führte, wurden diese zunächst als potentielle Bestandteile der CD46_{bov}-Bindungsdomäne bezeichnet. Rothwangl et al. (2008) beobachtete bei der Charakterisierung der CD81-Rezeptorbindungsdomäne im HCV E2, dass der Alaninaustausch bestimmter Aminosäuren nicht nur zum Verlust bzw. zur Reduktion der Rezeptorbindung führte. Infolge des Austausches konnte auch der konformationsabhängige Antikörper, der zum Nachweis der E2-Expression verwendet wurde, sein Epitop nicht mehr erkennen. Die Mutanten wurden daher in drei Gruppen unterteilt: vorhandene CD81-Bindung, nicht vorhandene CD81-Bindung bei adäquater E2-Expression und nicht vorhandene CD81-Bindung aufgrund einer veränderten Konformation des E2 Proteins (Rothwangl et al., 2008). Zwar ließ sich die Expression der NADL/ Alfort E2-Chimären nach dem Austausch der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ in der Western Blot Analyse nachweisen, jedoch fiel bei der Immunhistochemie auf, dass der Austausch des Aminosäureabschnittes Y₅₅LQRCTRET₆₃ eine deutliche Reduktion der Anzahl NADL E2 (Alfort 55-63/C59) exprimierender Zellen bewirkte. Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass es sich bei den Aminosäuremotiven H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und

Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ um potentielle Bestandteile der CD46_{bov}-Bindungsdomäne handelt. Hingegen konnte die Rolle der Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ bei der CD46_{bov}-Bindung aufgrund der herabgesetzten Expressionseffizienz nicht vollständig geklärt werden. Ein ähnliches Phänomen wurde für das Baculovirus Glykoprotein gp64 beschrieben (Kadlec et al., 2008). Mit Hilfe von Austauschmutanten sollte ein bestimmter Sequenzabschnitt innerhalb des gp64 auf seine Beteiligung an der Fusion untersucht werden. Bevor der Einfluss der Mutationen auf die Fusion getestet wurde, bestimmte man zunächst die Proteinexpression mittels Western Blot Analyse und Durchflusszytometrie. Dabei zeigte sich, dass alle Proteine exprimiert werden konnten, aber die Expressionseffizienz variierte (Kadlec et al., 2008).

Anders als erwartet reichte die Insertion der vier Sequenzabschnitte Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gV_{Ai}VPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ in das Alfort E2 nicht aus, um dessen Bindung an CD46_{bov} zu vermitteln. Es wäre daher denkbar, dass weitere Sequenzabschnitte im NADL E2 an der CD46_{bov}-Bindung beteiligt sind. Für deren Identifikation erwies sich der Zelladsorptionstest jedoch als ungeeignet, da bei diesem qualitativen Nachweisverfahren die E2-CD46_{bov}-Interaktion aufgrund der unterschiedlichen Stärke der E2-Expression nur schwer eingeschätzt werden kann. Deshalb wurde ein quantifizierbares Testverfahren (Zell-ELISA) entwickelt, das die Bestimmung der Interaktion zwischen CD46_{bov} und den chimären E2 Proteinen unter Berücksichtigung ihrer Oberflächenexpression ermöglichte. Als Grundlage hierfür diente der Zelladsorptionstest, der aufgrund seines einfachen Versuchsaufbaus die Untersuchung großer Probenzahlen mit geringem Zeitaufwand erlaubte. Um die Anzahl variabler Testkomponenten im Zell-ELISA zu verringern, wurden die CD46_{bov}-exprimierenden Zellen durch das lösliche Fusionsprotein CD46_{bov}-Fc_{hum} ersetzt, welches in jedem Experiment in einer definierten Menge eingesetzt werden konnte. Obwohl das humane Fc-Fragment in erster Linie der Aufreinigung des löslichen CD46_{bov} mittels Affinitätschromatographie diente (Birkmann et al., 2001), erwies es sich auch bei der Durchführung des Zell-ELISAs als nützlich. Bei Ko-Immunpräzipitationen zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen CD46_{bov} und E2 konnte beobachtet werden, dass die zur Verfügung stehenden Ziege-anti-CD46_{bov}-mAKs ihr Epitop nur mit Einschränkungen erkennen können, nachdem eine Bindung an E2 stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt). Das humane Fc-Fragment erlaubte jedoch den indirekten Nachweis gebundenen CD46_{bov} mittels des Peroxidase-gekoppelten anti-Human Antikörpers.

Die einzusetzende Menge des Fusionsproteins wurde im Zell-ELISA auf 5 µg/ pro Versuchsansatz festgelegt, da sich hierbei die im ELISA erzielten OD-Werte für NADL E2 (Positivkontrolle) und Alfort E2 (Negativkontrolle) exprimierende Zellen am stärksten unterschieden. Dass es sich trotz Verwendung großer Mengen an CD46_{bov}-Fc_{hum}, um eine spezifische Interaktion zwischen den E2 Proteinen und CD46_{bov} handelte, konnte nicht nur im ELISA, sondern auch in Infektionsstudien und mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden. Der große Bedarf an CD46_{bov}-Fc_{hum} für die optimale Auswertung des ELISAs deutet auf eine geringe Bindungsaffinität zwischen NADL E2 und CD46_{bov} hin. Bereits in vorausgegangenen Studien gab es erste Hinweise darauf, dass das BVD Virus nur mit geringer Affinität an seinen zellulären Rezeptor bindet. Es wurde daraufhin die Arbeitshypothese aufgestellt, dass es sich bei CD46_{bov} zwar um den hauptsächlich genutzten Rezeptor handelt, allerdings die Virusadsorption durch weitere, bislang noch unbekannte, zelluläre Faktoren stabilisiert wird (Krey 2004).

Die Vergleichbarkeit der im Zell-ELISA ermittelten Ergebnisse konnte gegenüber dem Zelladsorptionstest deutlich verbessert werden. Zum einen wurden bei der Berechnung der CD46_{bov}-Bindungsaktivität die gemessenen Unterschiede der Oberflächenexpression der chimären E2 Proteine berücksichtigt. Zum anderen konnten interexperimentell auftretende Abweichungen der Ergebnisse relativiert werden, indem die Schwellenwerte für jeden ELISA mit Hilfe von NADL E2- und Alfort E2-exprimierender Zellen neu festgelegt wurden. Diese wurden ebenfalls in die Berechnung der CD46_{bov}-Bindungsaktivität mit einbezogen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Zell-ELISAs fielen für die im Zelladsorptionstest positiv bewerteten NADL/ Alfort E2-Chimären deutliche Unterschiede in der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf. Während für die meisten E2-Chimären eine geringfügig bis mäßig reduzierte Wechselwirkung mit CD46_{bov} beobachtet werden konnte, zeigten NADL E2 (Alfort 59/ 104) und NADL E2 (Alfort 211-217) eine gesteigerte Rezeptorinteraktion. Mit den Chimären NADL E2 (Alfort 79-92), NADL E2 (Alfort 191-196), NADL E2 (Alfort 201-206) und NADL E2 (Alfort 236-241) wurden vier Domänen identifiziert, nach deren Austausch die CD46_{bov}-Bindungsaktivität unter 35% liegt. Aufgrund der deutlichen Beeinträchtigung sollten diese Peptidsequenzen bei der weiteren Charakterisierung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne vorrangig überprüft werden. Es wäre denkbar, dass eine oder mehrere dieser Aminosäureabschnitte an der Bildung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne mitbeteiligt sind, so dass

durch deren zusätzliche Insertion in das Alfort E2 dessen Bindung an CD46_{bov} erzielt werden könnte.

Welche der variablen Aminosäuren innerhalb des Sequenzabschnittes 79-92 (NADL E2 (Alfort 79-92)) für die Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität verantwortlich sind, wurde mittels der beiden E2-Chimären NADL E2 (Alfort 79-82) und NADL E2 (Alfort 87-92) näher charakterisiert. Der Einfluss der Aminosäuren 87-92 konnte aufgrund der herabgesetzten Expressionseffizienz der E2-Chimäre NADL E2 (Alfort 87-92) nicht direkt bestimmt werden. Dennoch sind sie für die Rezeptorbindungsaktivität von weniger als 35% verantwortlich, da der Austausch der Aminosäuren 79-82 (NADL E2 (Alfort 79-82)) zu einer geringeren Abnahme der CD46_{bov}-Bindung auf 73,7% führte.

Auch der mit der Chimäre NADL E2 (Alfort 142-150) charakterisierte Sequenzabschnitt des NADL E2 sollte in das Alfort E2 eingefügt werden, um dessen Bedeutung als Bestandteil der CD46_{bov}-Bindungsdomäne zu klären. Der Aminosäurenaustausch führte zu einer Abnahme der E2-CD46_{bov}-Wechselwirkung auf 51,7%. Darüber hinaus identifizierte Zhang et al. (2006) im Bereich der Aminosäuren 143-147 des Alfort E2 mit Hilfe einer durch Phagen präsentierten Random-Peptidbibliothek das SPTTL Motiv als Epitop des KSPV-neutralisierenden, monoklonalen Antikörpers A18. Dieses stellt eine potentielle Rezeptorbindungsstelle innerhalb des Glykoproteins E2 dar, da es innerhalb der Spezies KSPV hoch konserviert ist und nicht bei anderen Pestiviren vorkommt (Zhang et al., 2006). Möglicherweise handelt es sich bei den analogen Aminosäuren innerhalb des NADL E2 um einen Bestandteil der CD46_{bov}-Bindungsdomäne.

Auch könnten konformationelle Unterschiede zwischen Alfort und NADL E2 ursächlich dafür sein, dass die Insertion der vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ in das Alfort E2 nicht zu dessen Interaktion mit dem zellulären Rezeptor CD46_{bov} führte. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine, ist eine Aminosäureidentität von etwa 76% festzustellen (Weiland et al., 1990). Während der C-terminale Anteil des Glykoproteins E2 innerhalb der Genus *Pestivirus* hoch konserviert ist (Yu et al., 1996), kann die Aminosäureidentität im N-Terminus unter 40% liegen (van Rijn 2007). Dabei ist das Cysteinmuster von besonderem Interesse, denn KSPV E2 verfügt über zwei Cysteine weniger als das E2 Protein der restlichen Spezies innerhalb dieses Genus (Weiland et al., 1990; van Rijn et al., 1997). Dies könnte dazu führen,

dass das E2 Protein der Spezies KSPV eine inter- oder intramolekulare Disulfidbrücke weniger besitzt bzw. dass die paarweise Ausbildung der Disulfidbrücken verändert ist. Infolgedessen könnte es zu einer Konformationsänderung des E2 Proteins kommen, die die Bindung an CD46_{bov} beeinflusst (Weiland et al., 1990; van Rijn et al., 1997). Der Austausch der nicht konservierten Cysteine innerhalb des NADL E2 gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 (NADL E2 (Alfort 59/ 104)) führte jedoch nicht zu einem Verlust oder einer starken Beeinträchtigung der E2-CD46_{bov}-Wechselwirkung, sondern es wurde sogar eine Steigerung dieser Interaktion festgestellt. Auch die Insertion der beiden nicht konservierten Cysteine in das Alfort E2 veränderte dessen Rezeptorbindungsaktivität nicht (Daten nicht gezeigt). Es wäre allerdings denkbar, dass die Kombination der vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ mit den Cysteinen 59 und 104 die Bindung an CD46_{bov} bewirken könnte.

Ebenso wie das Vorkommen von Disulfidbrücken kann auch die Glykosylierung eines Proteins dessen Konformation und somit dessen Affinität zum Rezeptor beeinflussen (Gahmberg und Tolvanen 1996). Dies konnte neben zahlreichen anderen Virusproteinen auch für das E Protein des humanpathogenen Dengue Virus, einem Mitglied der Familie *Flaviviridae*, nachgewiesen werden. Es wurde hierbei beobachtet, dass die N-Glykosylierung des E Proteins entscheidend für dessen Interaktion mit dem Molekül DC-SIGN (CD209) auf der Oberfläche reifer, dendritischer Zellen ist (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003). N-Glykosylierungsstellen erkennt man anhand des Aminosäuremotivs Asparagin-X-Threonin bzw. Asparagin-X-Serin (Branza-Nichita et al., 2000). Innerhalb des KSPV E2 sind 6 konservierte N-Glykosylierungsstellen vorhanden, wovon zwei in der Aminosäuresequenz des E2 Proteins von NADL und den meisten anderen BVDV-Stämmen nicht vorkommen (Position 122 und 261). Allerdings bedeutet das Vorhandensein eines Glykosylierungsmotivs auch nicht in jedem Fall, dass das Protein an dieser Stelle glykosyliert wird. Inwiefern die potentiellen N-Glykosylierungsstellen die Bindung von NADL E2 an CD46_{bov} beeinflussen, wurde mit dem Austausch der Sequenzbereiche 124-127 (NADL E2 (Alfort 124-127)) und 258-261 (NADL E2 (Alfort 258-261)) geklärt. Weder im Zelladsorptionstest noch im Zell-ELISA konnte für eine der beiden E2-Chimären eine starke Beeinträchtigung der CD46_{bov}-Interaktion beobachtet werden. Der Einfluss der beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen auf die CD46_{bov}-Bindung ist zum jetzigen Zeitpunkt

zwar nicht vollständig auszuschließen, allerdings aufgrund von Untersuchungen von Risatti et al. (2007) eher unwahrscheinlich. Anhand des E2 Proteins des KSPV-Stammes Brescia wurde die Bedeutung einer potentiellen O- und sieben potentieller N-Glykosylierungsstellen für die Bildung und die Infektiosität von Viruspartikeln untersucht. Die Zerstörung einzelner Glykosylierungsstellen hatte keinen Effekt auf die Infektion *in vitro* oder *in vivo*. Eine Ausnahme bildete die N-Glykosylierungsstelle an Position 116 (bezogen auf die Aminosäuresequenz des KSPV E2), deren Mutation zur Attenuierung des Virus führte. Infolge der Zerstörung aller Glykosylierungsstellen war das Virus nicht mehr lebensfähig. Einzig die Wiederherstellung der N-Glykosylierungsstelle an Position 185 machte diesen Effekt wieder rückgängig (Risatti et al., 2007). Die Zerstörung der zwischen NADL und Alfort E2 nicht konservierten N-Glykosylierungsstellen an Position 122 und 261 hatte jedoch keine Veränderung der Infektiosität zur Folge. Ähnliche Ergebnisse erzielte man bei Untersuchungen, in denen die Bedeutung der Glykosylierung des HCV E2 für die CD81-Bindung geklärt werden sollte. Die Glykoproteine E2 der HCV Stämme Glasgow (Gla) und H77c unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, an CD81 zu binden, sowie in der Anzahl potentieller N-Glykosylierungsstellen (Patel et al., 2000). In der Aminosäuresequenz des E2 Proteins des Stammes H77c befinden sich zwei zusätzliche Glykosylierungsmotive (Positionen 93 und 149 bezogen auf die Aminosäuresequenz des HCV E2). Diese konnten in das E2 Protein des Stammes Glasgow eingefügt werden, ohne die CD81-Bindungsaktivität zu verändern (Patel et al., 2000). Auch der Einfluss der N-Glykosylierungsstellen auf die Infektiosität wurde untersucht. Dazu wurden pseudotypisierte Retroviren verwendet, die HCV E1-E2-Heterodimere des Stammes H exprimierten (Goffard et al., 2005). Durch den Austausch des Kodons für Asparagin wurden die einzelnen Glykosylierungsmotive innerhalb der Heterodimere zerstört. Obwohl dies bei einer Vielzahl von Mutanten zur Reduktion oder zum Verlust der Infektiosität führte, hatte die Zerstörung der nicht konservierten N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 93 und 149 im HCV E2 keine Veränderung der Infektiosität zur Folge (Goffard et al., 2005).

Wie anhand von KSPV und HCV gezeigt, ist die Glykosylierung des E2 Proteins von entscheidender Bedeutung bei der Infektion. Sie gibt dem Protein unter anderem die für die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor notwendige Struktur. Allerdings gibt es keine

Hinweise darauf, dass die Unterschiede in der Rezeptornutzung auf eine ungleiche Glykosylierung zurückzuführen sind.

4.2 Bedeutung der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅GgVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ für die CD46_{bov}-Bindung

Nachdem der Austausch der vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ im NADL E2 zu einem Verlust der CD46_{bov}-Bindung geführt hatte, sollten diese detailliert untersucht werden. Ziel war es dabei, die für die CD46_{bov}-Interaktion minimal benötigten Aminosäuren innerhalb dieser Sequenzabschnitte zu definieren. Dazu wurden die Peptidsequenzen in zwei bis vier Unterabschnitte eingeteilt, die in verschiedenen Kombinationen durch die analogen Aminosäuren des Alfort E2 ersetzt wurden (Abb. 8). Der Einfluss jedes einzelnen Abschnittes auf die Bindung von NADL E2 an CD46_{bov} wurde sowohl im Zelladsorptionstest als auch im Zell-ELISA analysiert. Die quantitative Bestimmung der E2-CD46_{bov}-Wechselwirkung im Zell-ELISA erwies sich dabei jedoch als besonders wertvoll (Abb. 25/ 26).

Die Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ wurde in vier Unterabschnitte unterteilt. Der erste Unterabschnitt, bestehend aus Tyrosin55 (Y) und Leucin56 (L), wurde aufgrund der stark reduzierten Oberflächenexpression der E2-Chimäre NADL E2 (Y₅₅LALCVVSR₆₃) mit Hilfe des Plasmids pE2_(p1-56/b57-293/p294-396) (Himmelreich 2003) untersucht. Dabei handelt es sich, um eine NADL/ Alfort E2-Chimäre, welche die für die CD46_{bov}-Bindung benötigte „Minimalsequenz“ (Aminosäure 57-293) des NADL E2 enthält. Dieses chimäre Protein wies eine CD46_{bov}-Bindungsaktivität von ca. 104% auf, womit eine Relevanz von Tyrosin55 und Leucin56 für die CD46_{bov}-Bindung ausgeschlossen werden konnte. Nachdem sowohl für NADL E2 (V₅₅TQRCVVSR₆₃) als auch NADL E2 (V₅₅TALCTR_{SR}₆₃) und NADL E2 (V₅₅TALCVVET₆₃) eine CD46_{bov}-Bindungsaktivität nachgewiesen wurde, konnte innerhalb der Peptidsequenz Y₅₅LQRCTRET₆₃ der für die CD46_{bov}-Bindung relevante Bereich auf die Aminosäuren Q₅₇RCTRET₆₃ eingegrenzt werden. Dabei kommt den Aminosäuren Glutaminsäure62 (E) und Threonin63 (T) die größte Bedeutung zu, denn infolge des Austausches des Sequenzabschnittes Y₅₅LQRCTRET₆₃ gegen V₅₅TALCVVET₆₃ kam es zur geringsten Abnahme der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf etwa 86%. Bei der näheren Charakterisierung der beiden Aminosäuren konnte beobachtet werden, dass Glutaminsäure62

einen stärkeren Einfluss auf die CD46_{bov}-Bindungsaktivität besitzt als Threonin63, denn nachdem der Sequenzabschnitt Y₅₅LQRCTRET₆₃ gegen V₅₅TALCVVER₆₃ (NADL E2 (V₅₅TALCVVER₆₃)) ersetzt wurde, reduzierte sich die CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 56%. Hingegen führte der Austausch dieses Sequenzabschnitts gegen V₅₅TALCVVST₆₃ (NADL E2 (V₅₅TALCVVST₆₃)) zu einer Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 37%.

Der Austausch der Aminosäuren Histidin179 (H) und Asparagin180 (N) innerhalb der Peptidsequenz H₁₇₉NcI₁₈₂ (NADL E2 (E₁₇₉HcI₁₈₂)) führte zu einem vollständigen Verlust der CD46_{bov}-Bindung, während der Austausch des Isoleucin182 (I) gegen Lysin (K) (NADL E2 (H₁₇₉NcK₁₈₂)) eine Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf 46% bewirkte. Somit können die Aminosäuren Histidin179 und Asparagin180 als für die CD46_{bov}-Bindung essentielle Aminosäuren eingestuft werden.

Die Peptidsequenz E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ wurde in einen N-terminalen (E₂₄₅gvA₂₄₈), mittleren (i₂₄₉VPQ₂₅₂) und C-terminalen (g₂₅₃TLK₂₅₆) Unterabschnitt eingeteilt. Deren Austausch durch die analogen Aminosäuren des Alfort E2 erfolgte sowohl einzeln als auch in verschiedenen Kombinationen. Dabei konnte für keine der sechs E2-Chimären NADL E2 (E₂₄₅gvAiSTEGEHE₂₅₆), NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgEHE₂₅₆) NADL E2 (D₂₄₅gvViSTEGTLK₂₅₆) bzw. NADL E2 (D₂₄₅gvViVPQgTLK₂₅₆), NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHE₂₅₆) und NADL E2 (D₂₄₅gvAiSTEGTLK₂₅₆) eine Bindung an CD46_{bov} nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass in allen drei Abschnitten mindestens eine für die CD46_{bov}-Interaktion essentielle Aminosäure vorkommen muss. Um zu klären, welche der beiden variablen Aminosäuren (Glutaminsäure245 (E) oder Alanin248 (A)) im N-terminalen Abschnitt für die Aufrechterhaltung der Rezeptorbindung notwendig ist, wurde Glutaminsäure245 gegen Asparaginsäure (D) ersetzt. Nachdem die entstandene Chimäre NADL E2 (D₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆) noch immer in der Lage war, an CD46_{bov} zu binden, wurde davon ausgegangen, dass das Alanin248 (A) an der CD46_{bov}-Bindung wesentlich beteiligt ist. Für die Charakterisierung des C-terminalen Abschnittes g₂₅₃TLK₂₅₆ wurde die Chimäre NADL E2 (E₂₄₅gvAiVPQgEHLK₂₅₆) hergestellt. Infolge des Austausches des Threonins254 (T) und des Leucins255 (L) gegen die analogen Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Histidin (H) kam es zu einem Verlust der CD46_{bov}-Bindung. Das bedeutete, dass es sich bei Threonin254 und Leucin255 ebenfalls um für die Rezeptorbindung essentielle Aminosäuren handelt. Auf diese Weise war es möglich, den für die CD46_{bov}-Interaktion

essentiellen Anteil der Peptidsequenz E₂₄₅gV*AiVPQgTLK*₂₅₆ auf die Aminosäuren A₂₄₈iVPQgTL₂₅₅ einzuengen. Dies wurde zusätzlich mittels der Mutante NADL E2 (D₂₄₅gV*AiVPQgTL*E₂₅₆) bestätigt, welche nach dem Austausch von Glutaminsäure₂₄₅ (E) gegen Asparaginsäure (D) und Lysin₂₅₆ (K) gegen Glutaminsäure₂₅₆ (E) eine CD46_{bov}-Bindungsaktivität von ca. 47% aufwies.

Bei der Charakterisierung der Peptidsequenz Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Isoleucin₂₆₇ (I) und Methionin₂₆₉ (M) ausreichend sind, um die Rezeptorbindung aufrecht zu erhalten. Während es nach deren Austausch (NADL E2 (K₂₆₅vHaLdTK₂₇₂) und NADL E2 (Q₂₆₅vHaLdER₂₇₂)) zu einem Verlust der CD46_{bov}-Bindung kam, wurde bei deren Erhalt (NADL E2 (K₂₆₅vIaMdER₂₇₂)) eine geringe CD46_{bov}-Bindungsaktivität von 27% gemessen. Eine essentielle Bedeutung der Aminosäuren Glutamin₂₆₅ (Q), Threonin₂₇₁(T) und Lysin₂₇₂ (K) für die CD46_{bov}-Bindung wurde ausgeschlossen.

Ein Sequenzvergleich der vier Peptide Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gV*AiVPQgTLK*₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ mit den analogen Abschnitten der E2 Proteine verschiedener BVDV und KSPV-Stämme ergänzte die anhand des Zell-ELISAs getroffenen Aussagen. Während die vier Peptidsequenzen des E2 Proteins innerhalb der Spezies KSPV hoch konserviert sind, konnte für die verschiedenen BVDV-Stämme keine ausgeprägte Aminosäureidentität nachgewiesen werden. Allerdings verfügten die analogen Aminosäuren meistens über die gleichen physikalischen Eigenschaften. Bei genauerer Betrachtung der für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Unterabschnitte konnte jeweils für mindestens eine Aminosäure ein Ladungsunterschied zwischen KSPV und BVDV E2 festgestellt werden (Abb.27). Diese sind sehr wahrscheinlich für die unterschiedliche CD46_{bov}-Nutzung verantwortlich, was jedoch mit Hilfe weiterer NADL/ Alfort E2-Chimären untersucht werden muss. Eine Ausnahme stellt das Alanin₂₄₈ im N-terminalen Unterabschnitt (E₂₄₅gV*A*₂₄₈) des Peptides E₂₄₅gV*AiVPQgTLK*₂₅₆ dar, das sich von dessen analogen Aminosäure Valin in der Größe, aber nicht in der Ladung unterscheidet.

Obwohl für die Aminosäuren Isoleucin₁₈₂ (I), Glutaminsäure₂₄₅ (E), Lysin₂₅₆ (K), Glutamin₂₆₅ (Q), Threonin₂₇₁ (T) und Lysin₂₇₂ (K) eine essentielle Bedeutung für die Interaktion zwischen CD46_{bov} und NADL E2 ausgeschlossen werden konnte, kam es infolge ihres Austausches zu einer Reduktion der CD46_{bov}-Bindungsaktivität auf weniger als 50%.

Bei der anschließenden Sequenzanalyse stellte man für Isoleucin182, Lysin256, Glutamin265 und Threonin271 fest, dass sie sich ebenfalls in ihrer Ladung von den analogen Aminosäuren des KSPV E2 unterscheiden. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es denkbar, dass diese vier Aminosäuren die CD46_{bov}-Bindung beeinflussen, auch wenn ihnen dabei keine essentielle Rolle zukommt.

55 <u>YLQRCTRET</u> 63	<u>BVDV-1 NADL</u>	179 <u>HNcI</u> 182
<u>YLITCEREA</u>	BVDV-1 Osloss	<u>YDcA</u>
<u>IMERCAREA</u>	BVDV-1 519	<u>HDcT</u>
<u>YLSRCTRET</u>	BVDV-1 SD-1	<u>YDcA</u>
<u>FVQKCKTET</u>	BVDV-1 SH9	<u>YNcV</u>
<u>ILKTCTKEE</u>	BVDV-1 SF4	<u>HEcV</u>
<u>YLIRCGREA</u>	BVDV-1 NZP7	<u>YDcA</u>
<u>FVQKCKTET</u>	BVDV-2 Parker	<u>HEcI</u>
<u>ILKTCPKKEE</u>	BVDV-2 890	<u>HEcI</u>
<u>VTALNVVSR</u>	<u>KSPV Alfort</u>	<u>FHcK</u>
<u>VTALNVVSR</u>	KSPV Brescia	<u>FYcK</u>
<u>VTALNVVSR</u>	KSPV Moormann	<u>FYcK</u>
<u>VTALNVVSR</u>	KSPV Glentorf	<u>FYcK</u>
<u>VTALNVVSR</u>	KSPV Riems	<u>FYcK</u>
245 <u>EgvAiVPQgTLK</u> 256	<u>BVDV-1 NADL</u>	265 <u>QvIaMdTK</u> 272
<u>DgvAiVPTgSVK</u>	BVDV-1 Osloss	<u>QvIaMdDK</u>
<u>DgvAiVPQgTVK</u>	BVDV-1 519	<u>QvIaLdTK</u>
<u>EgvAiVPHgLVK</u>	BVDV-1 SD-1	<u>QvIaTdTK</u>
<u>DgvAiVQHgTVK</u>	BVDV-1 SH9	<u>QvIaMdTK</u>
<u>GgvAiVPTgTVK</u>	BVDV-1 SF4	<u>QvIaTNND</u>
<u>NgvAiVPSgTVK</u>	BVDV-1 NZP7	<u>QvIaMdDK</u>
<u>GgvAiVPTgTVK</u>	BVDV-2 Parker	<u>QvIaTNKD</u>
<u>GgvAiVPTgTVK</u>	BVDV-2 890	<u>QvVaSNND</u>
<u>DgvViSTeGEHE</u>	<u>KSPV Alfort</u>	<u>KvHaLdER</u>
<u>DgvViSTeGSHE</u>	KSPV Brescia	<u>KvHaLdER</u>
<u>DgvViSTeGSHE</u>	KSPV Moormann	<u>KvHaLdER</u>
<u>DgvViSTeGSHE</u>	KSPV Glentorf	<u>KvHaSdER</u>
<u>DgvViSTeGSHE</u>	KSPV Riems	<u>KvHaSdER</u>

Abb. 27: Sequenzvergleich der vier Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ mit den analogen Aminosäuren verschiedener BVDV-1, BVDV-2 und KSPV-Stämme

Die Sequenzabschnitte des BVDV NADL E2 sind rot und die des KSPV Alfort E2 grün hervorgehoben. Die für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Aminosäuren wurden grau hinterlegt und die geladenen Aminosäuren unterstrichen. Der gelbe Rahmen kennzeichnet das Alanin₂₄₈ und dessen Analog Valin, die sich nicht in der Ladung, sondern in der Größe unterscheiden.

In dieser Arbeit konnten im NADL E2 vier für die CD46_{bov}-Bindung essentielle Aminosäureabschnitte identifiziert werden (Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gvAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂). Die Beteiligung mehrere Sequenzabschnitte deutet auf eine konformationelle Struktur der Rezeptorbindungsdomäne hin. Dies ist sehr wahrscheinlich, da die BVDV-Bindungsdomäne im CD46_{bov} von zwei Peptidsequenzen gebildet wird, welche sich auf zwei antiparallel zueinander gelegenen β -Faltblattstrukturen befinden (Krey et al., 2006a). Die Insertion dieser vier Aminosäureabschnitte in das Alfort E2 reichte jedoch nicht aus, um dessen Interaktion mit CD46_{bov} hervorzurufen. Als Ursache hierfür muss neben konformationellen Unterschieden zwischen NADL und Alfort E2 auch die Beteiligung weiterer Sequenzabschnitte an der CD46_{bov}-Bindung in Betracht gezogen werden. Mit Hilfe des Zell-ELISAs wurde gezeigt, dass weder der Austausch der nicht konservierten Cysteine noch der nicht konservierten, potentiellen N-Glykosylierungsstellen die CD46_{bov}-Bindungsaktivität erheblich beeinflussten. Jedoch wurden vier Peptidsequenzen identifiziert, deren Austausch gegen die analogen Sequenzen des Alfort E2 zu einer starken Beeinträchtigung der E2-CD46_{bov}-Wechselwirkung führte. Diese neu identifizierten Peptide stellen die Basis für weitere Studien dar, um die Beteiligung einzelner oder mehrerer dieser Abschnitte an der Bildung der Rezeptorbindungsdomäne zu klären.

Obwohl die CD46_{bov}-Bindungsdomäne im NADL E2 nicht eindeutig definiert werden kann, findet man Parallelen zu den hier gezeigten Ergebnissen bei Untersuchungen zur Charakterisierung der CD81-Bindungsdomäne im E2 Protein des verwandten Hepatitis C Virus. Antikörperbindungsstudien weisen auf die konformationelle Struktur der Rezeptorbindungsstelle im HCV E2 hin, die von mehreren Epitopen gebildet wird (Flint et al., 1999). Mittels Alaninsubstitutionen wurden bislang drei Domänen identifiziert, die an der Bindung der CD81-Bindungsdomäne beteiligt sind (Drummer et al., 2006; Rothwangl et al.,

2008). Diese befinden sich interessanterweise ebenso wie Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gV_{Ai}VPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ im N- und C-Terminus sowie in der Mitte der Aminosäuresequenz des Glykoproteins E2 (Abb. 28).

		20	40	
NADL E2	1	HL DCKPEFSYAI AKDERIGQLGA EGLTTTWKEYSPGMKLED TMVIAWCEDGKLM	MYLQRCT	60
HCV E2	1	ETHVTGGNAGR TTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWL	AGLGFY	60
		80	100	
NADL E2	61	RETRYLA I L HTRALPTSVVFKKLF DGRKQEDV VEMNDNF EFGLCPCDAKPIVRGKFNTTL		120
HCV E2	61	QHKFNSSGCPERLASCRRLT DFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPGI VPAKSVC		120
		140	160	
NADL E2	121	LNGPAFQMVCP I GWTGTVSCTSFNMDTLATTVVRTYRRSKPFP HRQGCITQKNLGEDL	HN	180
HCV E2	121	GPVYCFTPSPVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFV LNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKV		180
		200	220	
NADL E2	181	CI LGGNWTCVPGDQLLYKGSIESCKWCGYQFKESEGLPHYPIGKCKLENETGYRLVDST		240
HCV E2	181	CGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDY	PYRLWHYPCTIN	240
		260	280	
NADL E2	241	SCNREGVA IVPQGT LKCKIGKTTVQVIAMDTKLGPMPCRPYEII SSEGPVEKTACTFN	YNT	300
HCV E2	241	YTIFKVRMYVGGVEHRL EAA CNWTRGERCDLED RSELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTLP		300
		320	340	
NADL E2	301	KTLKNKYFEPRDSYFQQYMLKGEYQYWF DLEVTDHHRDYFAESILVVVVALLGGRYVLWL		360
HCV E2	301	ALSTGLIHLHQNI VDVQYLYGVGSSIASWAIKWEYVVLFLLLADARVCSCLWMLLISQ		360
NADL E2	361	LVTYMLV LSEQKALG		374
HCV E2	361	QAE AAL		365

Abb. 28: Verteilung der potentiellen Rezeptorbindungsdomänen im Glykoprotein E2 von BVDV NADL und HCV

Dargestellt sind die vollständigen Aminosäuresequenzen der Glykoproteine E2 von BVDV NADL (NADL E2) und HCV Stamm H77c (HCV E2). Die wahrscheinlich in der CD46_{bov}-Bindung involvierten Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gV_{Ai}VPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ des NADL E2 sind rot markiert. Bei den drei blau gekennzeichneten Aminosäureabschnitten im HCV E2 handelt es sich um die an der CD81-Bindung beteiligten Domänen (Drummer et al., 2006; Rothwangl et al., 2008).

Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen weisen auf eine komplexe Struktur der CD46_{bov}-Bindungsdomäne hin. Daher lässt sich nur anhand einer Kristallstruktur des NADL E2 verifizieren, ob die hier identifizierten Peptidsequenzen die CD46_{bov}-Bindung

beeinflussen, indem sie die Konformation der Rezeptorbindungsdomäne verändern oder als deren Bestandteile direkt mit CD46_{bov} interagieren.

5 Zusammenfassung

In vorausgegangenen Studien konnte mit Hilfe von NADL/ Alfort E2-Chimären die für die CD46_{bov}-Bindung minimal benötigte Sequenz innerhalb des NADL E2 auf die Aminosäuren 57-293 eingeengt werden. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss dieser Aminosäuren auf die Rezeptorbindung näher untersucht, um die für die E2-CD46_{bov}-Interaktion benötigte Sequenz weiter einschränken zu können. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

1. Es wurden 24 NADL/ Alfort E2-Chimären hergestellt und deren Bindung an CD46_{bov} im Zelladsorptionstest getestet. Dabei konnten im NADL E2 vier Peptidsequenzen (Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂) identifiziert werden, deren Austausch gegen die analogen Aminosäuren des Alfort E2 zu einem Verlust der Bindung an CD46_{bov} führte. Die Insertion dieser vier potentiellen Bestandteile der Rezeptorbindungsdomäne in das Alfort E2 vermittelte jedoch keine Interaktion mit CD46_{bov}.
2. Die Etablierung eines Zell-ELISAs ermöglichte die Quantifizierung der Bindung zwischen CD46_{bov} und den chimären E2 Proteinen unter Berücksichtigung der E2-Expression. Dazu wurde das lösliche Fusionspeptid CD46_{bov}-Fc_{hum} hergestellt, angereichert und aufgereinigt sowie dessen Menge bestimmt. Die Bindungsspezifität des Proteins wurde mittels konfokaler Mikroskopie, in Infektionsstudien und im ELISA überprüft.
3. Der Zell-ELISA ermöglichte die Identifikation vier weiterer Peptidsequenzen, deren Austausch zu einer Abnahme der CD46_{bov}-Bindungsaktivität unter 35% führte. Es wäre denkbar, dass eine oder mehrere dieser Aminosäureabschnitte an der Bildung der CD46_{bov}-Bindungsdomäne mitbeteiligt sind. Eine Steigerung der CD46_{bov}-Bindungsaktivität konnte beobachtet werden, nachdem die beiden zwischen NADL und Alfort E2 nicht konservierten Cysteine ausgetauscht wurden. Hingegen hatte die Insertion zweier zusätzlicher potentieller N-Glykosylierungsstellen keine bzw. eine mäßige Reduktion der Rezeptorbindung zur Folge.
4. Die Peptidsequenzen Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ konnten auf die für die CD46_{bov}-Bindung essentiellen Aminosäuren Q₅₇RCTRET₆₃, H₁₇₉N₁₈₀, A₂₄₈iVPQgTL₂₅₅ und I₂₆₇aM₂₆₉ eingegrenzt werden. Beim Sequenzvergleich dieser Abschnitte mit den analogen Aminosäuren verschiedener BVDV und

KSPV-Stämme wurden vorwiegend Ladungsunterschiede festgestellt, welche vermutlich für das unterschiedliche Bindungsverhalten von KSPV und BVDV E2 an CD46_{bov} verantwortlich sind.

6 Summary

In previous studies, constructs that express chimeric E2, namely NADL/ Alfort, were employed to determine that the minimal sequence of the NADL E2 protein to interact with the bovine CD46_{bov} comprises the amino acids 57-293.

Based on these studies, the influence of these residues on the binding to the receptor was characterized in more detail, to further narrow the sequence required for the E2-CD46_{bov} interaction. The following results were achieved:

1. 24 NADL/ Alfort E2-chimeras were generated and their binding activity to CD46_{bov} was tested in a cell adsorption assay. Here four peptidic sequences were identified (Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ und Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂), that when exchanged against the analogue amino acids of the Alfort E2 lead to a loss of binding to CD46_{bov}. The insertion of these four potential components of the receptor binding domains in the Alfort E2, however, were not sufficient to mediate interaction with CD46_{bov}.
2. The optimization of a Cell-ELISA enabled to quantitatively assess the interaction between CD46_{bov} and the E2-chimeras considering the E2-expression in each case. Therefore the soluble fusion protein CD46_{bov}-Fc_{hum} was generated and purified. The binding specificity of the protein was verified by laser scanning confocal microscopy, infection studies and ELISA.
3. The Cell-ELISA allowed the identification of four additional peptides, that when exchanged lead to a reduction of the binding activity to CD46_{bov} below 35%. It might be that one or more of these peptides are part of the binding domain to CD46_{bov}. An increase in the binding activity to CD46_{bov} could be observed when the two cysteine residues were exchanged that are conserved between NADL and Alfort. On the contrary, the insertion of the two additional potentially N-glycosylation sites caused no or a slight reduction in the receptor binding.
4. The peptide sequences Y₅₅LQRCTRET₆₃, H₁₇₉NcI₁₈₂, E₂₄₅gVAiVPQgTLK₂₅₆ and Q₂₆₅vIaMdTK₂₇₂ were modified individually, to identify the essential fragment for the binding to CD46_{bov}. The peptides Q₅₇RCTRET₆₃, H₁₇₉N₁₈₀, A₂₄₈iVPQgTL₂₅₅ and I₂₆₇aM₂₆₉, were the minimal sequence needed from each respective fragment. When the sequence of these fragments were compared with the analogue amino acids from different BVDV and CSFV-

strains, mainly charge differences were observed, which are very likely responsible for the different binding of CSFV and BVDV E2 to CD46_{bov}.

7 Literaturverzeichnis

Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight und Q. X. Zhang (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (22): 12766-71.

Akeson, A. L. und C. W. Woods (1993). A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J Immunol Methods* **163** (2): 181-5.

Baker, J. C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190** 1449-1458.

Barth, H., T. J. Liang und T. F. Baumert (2006). Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* **44** (3): 527-35.

Bartosch, B. und F. L. Cosset (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* **348** (1): 1-12.

Becher, P., R. Avalos Ramirez, M. Orlich, S. Cedillo Rosales, M. König, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirrmeier und H. J. Thiel (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* **311** (1): 96-104.

Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth und H.-J. Thiel (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262** (1): 64-71.

Becher, P., M. Orlich und H. J. Thiel (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* **72** (6): 5165-5173.

Birkmann, A., K. Mahr, A. Ensser, S. Yaguboglu, F. Titgemeyer, B. Fleckenstein und F. Neipel (2001). Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol* **75** (23): 11583-93.

Branza-Nichita, N., D. Durantel, S. Carrouee-Durantel, R. A. Dwek und N. Zitzmann (2001). Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J Virol* **75** (8): 3527-36.

Branza-Nichita, N., A. J. Petrescu, G. Negroiu, R. A. Dwek und S. M. Petrescu (2000). N-glycosylation processing and glycoprotein folding-lessons from the tyrosinase-related proteins. *Chem Rev* **100** (12): 4697-712.

Buchholz, C. J., U. Schneider, P. Devaux, D. Gerlier und R. Cattaneo (1996). Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion. *J Virol* **70** (6): 3716-23.

- Cedillo Rosales, S. (2004). Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasenkettenreaktion und monoklonaler Antikörper. Justus-Liebig-Universität, Giessen. Dissertation
- Christiansen, D., E. R. De Sousa, B. Loveland, P. Kyriakou, M. Lanteri, F. T. Wild und D. Gerlier (2002). A CD46CD[55-46] chimeric receptor, eight short consensus repeats long, acts as an inhibitor of both CD46 (MCP)- and CD150 (SLAM)-mediated cell-cell fusion induced by CD46-using measles virus. *J Gen Virol* **83** (Pt 5): 1147-55.
- Chung, L. P. und K. B. Reid (1985). Structural and functional studies on C4b-binding protein, a regulatory component of the human complement system. *Biosci Rep* **5** (10-11): 855-65.
- Cocquerel, L., C. Voisset und J. Dubuisson (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87** (Pt 5): 1075-84.
- Collett, M. S., D. K. Anderson und E. Retzel (1988a). Comparisons of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. *J Gen Virol* **69** 2637-2643.
- Collett, M. S., R. Larson, S. K. Belzer und E. Retzel (1988b). Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165** (1): 200-8.
- Collett, M. S., R. Larson, C. Gold, D. Strick, D. K. Anderson und A. F. Purchio (1988c). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165** 191-199.
- Corapi, W. V., R. O. Donis und E. J. Dubovi (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea infections. *J Virol* **62** 2823-2827.
- Deng, R. und K. V. Brock (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* **191** 867-879.
- Depner, K., T. Bauer und B. Liess (1992). Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech* **11** (3): 885-93.
- Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra und C. D. Richardson (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75** (2): 295-305.
- Drummer, H. E., I. Boo, A. L. Maerz und P. Pournbourios (2006). A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry. *J Virol* **80** (16): 7844-53.
- Dunne, H. W. (1973). Hog cholera (european swine fever) *Adv Vet Sci Comp Med* **17** 315-359.

- Edwards, S., A. Fukusho, P. C. Lefevre, A. Lipowski, Z. Pejsak, P. Roehe und J. Westergaard (2000). Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* **73** (2-3): 103-19.
- Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, T. Rümenapf und H.-J. Thiel (1996). Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol* **70** (6): 4131-4135.
- Enzmann, P. J. und F. Weiland (1978). Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Arch Virol* **57** (4): 339-48.
- Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz und C. M. Rice (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446** (7137): 801-5.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff und U. D. a. L. A. Ball (2005). *Virus Taxonomy-Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Family Flaviviridae. San Diego, USA, Elsevier Academic Press.*
- Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy und J. A. McKeating (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **73** (8): 6235-44.
- Flores, E. F. und R. O. Donis (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* **208** (2): 565-575.
- Fritzemeier, J., L. Haas, E. Liebler, V. Moennig und I. Greiser-Wilke (1997). The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol* **142** (7): 1335-50.
- Gahmberg, C. G. und M. Tolvanen (1996). Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* **21** (8): 308-11.
- Garry, R. F. und S. Dash (2003). Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307** (2): 255-65.
- Gillespie, J. H., J. A. Baker und K. McEntee (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet* **50** 73-79.
- Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F. L. Cosset, C. Montpellier und J. Dubuisson (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **79** (13): 8400-9.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen und H. Bujard (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** (5218): 1766-9.

- Grummer, B., M. Beer, E. Liebler-Tenorio und I. Greiser-Wilke (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* **82** 2597-2605.
- Grummer, B., V. Moennig und I. Greiser-Wilke (1998). [Cytopathogenic bovine viral diarrhea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures]. *Dtsch Tierärztl Wschr* **105** (1): 29-31.
- Hamblin, C. und R. S. Hedger (1979). The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhea / mucosal disease virus in African wildlife. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **2** 295-303.
- Harada, T., N. Tautz und H. J. Thiel (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* **74** (20): 9498-506.
- Hausmann, Y., G. Roman-Sosa, H. J. Thiel und T. Rümenapf (2004). Classical swine fever virus glycoprotein Erns is an endoribonuclease with an unusual base specificity. *J Virol* **78** (10): 5507-5512.
- Himmelreich, A. (2003). Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor CD46 und dem viralen Liganden von BVDV. Justus-Liebig-Universität, Giessen. Dissertation
- Horzinek, M., J. Maess und R. and Laufs (1971). Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* **33** (3): 306-8.
- Horzinek, M., E. Reczko und K. and Petzoldt (1967). On the morphology of hog cholera virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **21** (3): 475-8.
- Hourcade, D., V. M. Holers und J. P. Atkinson (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol* **45** 381-416.
- Hulst, M. M. und R. J. Moormann (1997). Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins Erns and E2 of classical swine fever virus: Erns and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* **78** 2779-2787.
- Hulst, M. M. und R. J. Moormann (2001). Erns protein of pestiviruses. *Methods Enzymol* **342** 431-40.
- Hulst, M. M., H. G. van Gennip, A. C. Vlot, E. Schooten, A. J. de Smit und R. J. Moormann (2001). Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J Virol* **75** (20): 9585-9595.
- Hulst, M. M., D. F. Westra, G. Wensvoort und R. J. Moormann (1993). Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol* **67** (9): 5435-42.

- Iqbal, M., H. Flick-Smith und J. W. McCauley (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **81** (Pt 2): 451-9.
- Iqbal, M., E. Poole, S. Goodbourn und J. W. McCauley (2004). Role for bovine viral diarrhoea virus E(rns) glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* **78** (1): 136-45.
- Kadlec, J., S. Loureiro, N. G. Abrescia, D. I. Stuart und I. M. Jones (2008). The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* **15** (10): 1024-30.
- Kallstrom, H., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson und A. B. Jonsson (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25** (4): 639-47.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmacol* **162** 480.
- Kielian, M. und S. Jungerwirth (1990). Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Mol Biol Med* **7** (1): 17-31.
- Kielian, M. und F. A. Rey (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* **4** (1): 67-76.
- Köhl, W., G. Zimmer, I. Greiser-Wilke, L. Haas, V. Moennig und G. Herrler (2004). The surface glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus contains an intracellular localization signal. *J Gen Virol* **85**: 1101-1111.
- König, M., T. Lengsfeld, T. Pauly, R. Stark und H. J. Thiel (1995). Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* **69** (10): 6479-6486.
- Krey, T. (2004). Charakterisierung des Invasionsmechanismus des Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV). Justus-Liebig-Universität, Giessen. Dissertation
- Krey, T., A. Himmelreich, M. Heimann, C. Menge, H. J. Thiel, K. Maurer und T. Rumenapf (2006a). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol* **80** (8): 3912-3922.
- Krey, T., E. Moussay, H. J. Thiel und T. Rumenapf (2006b). Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **80** (21): 10862-7.
- Krey, T., H. J. Thiel und T. Rumenapf (2005). Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol* **79** (7): 4191-200.

- Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker und J. H. Strauss (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108** (5): 717-25.
- Lackner, T., A. Muller, M. Konig, H. J. Thiel und N. Tautz (2005). Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol* **79** (15): 9746-55.
- Lackner, T., A. Muller, A. Pankraz, P. Becher, H. J. Thiel, A. E. Gorbalenya und N. Tautz (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* **78** (19): 10765-75.
- Lazar, C., N. Zitzmann, R. A. Dwek und N. Branza-Nichita (2003). The pestivirus glycoprotein E(rns) interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* **30** (314): 696-705.
- Lescar, J., A. Roussel, M. W. Wien, J. Navaza, S. D. Fuller, G. Wengler, G. Wengler und F. A. Rey (2001). The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* **105** (1): 137-48.
- Liang, D., I. F. Sainz, I. H. Ansari, L. H. Gil, V. Vassilev und R. O. Donis (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol* **84** (Pt 5): 1269-74.
- Liess, B. (1967). Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im sogenannten "Mucosal Disease Komplex" bei Rindern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **74** 46-49.
- Liess, B., H. R. Frey, H. Kittsteiner, F. Baumann und W. Neumann (1974). [Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection"]. *Dtsch Tierarztl Wschr* **81** (20): 481-7.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Prágai, D. W. McCourt und C. M. Rice (1994). Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2- specific products with different C termini. *J Virol* **68** 5063-5073.
- Lindenbach, B. D. und C. M. Rice (2001). In *Fields Virology. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Philadelphia, New York, Lippincott - Raven Publishers.
- Lindenbach, B. D., H. J. Thiel und C. M. Rice (2007). In *Fields Virology. Flaviviridae: The viruses and their replication*. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven Publishers.
- Liszewski, M. K. und J. P. Atkinson (1992). Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol* **178** 45-60.

- Marsh, M. und A. Helenius (1989). Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res* **36** 107-51.
- Maurer, K. (2002). Identifizierung eines zellulären Rezeptors für das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) : Reinigung, Klonierung und Expression des bovinen CD46 (MCP). Justus-Liebig-Universität, Giessen. Dissertation
- Maurer, K., T. Krey, V. Moennig, H.-J. Thiel und T. Rümenapf (2004). CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol* **78** (4): 1792-9.
- McClurkin, A. W., S. R. Bolin und M. F. Coria (1985). Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* **186** (6): 568-9.
- Meyer, C., M. Von Freyburg, K. Elbers und G. Meyers (2002). Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol* **76** (16): 8494-503.
- Meyers, G., A. Saalmüller und M. Büttner (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* **73** (12): 10224-35.
- Meyers, G., N. Tautz, P. Becher, H.-J. Thiel und B. Kümmerer (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J Virol* **70** (12): 8606-8613.
- Meyers, G. und H. J. Thiel (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* **47** 53-118.
- Moennig, V., H.-R. Frey, E. Liebler, P. Polenz und B. Liess (1990). Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec* **127** 200-203.
- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe und D. Gerlier (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67** (10): 6025-32.
- Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos und P. Despres (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* **4** (7): 723-8.
- Okada, N., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson und M. Caparon (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (7): 2489-93.

- Patel, A. H., J. Wood, F. Penin, J. Dubuisson und J. A. McKeating (2000). Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol* **81** (Pt 12): 2873-83.
- Paton, D. J., V. Simpson und S. H. Done (1992). Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet Rec* **131** (9): 185-8.
- Pe'ery, T. und M. B. Mathews (2007). In *Fields Virology*. Viral conquest of the host cell. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Pellerin, C., J. Van Den Hurk, J. Lecomte und P. Tijssen (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203** 260-268.
- Poole, T. L., C. Wang, R. A. Popp, L. N. D. Potgieter, A. Siddiqui und M. S. Collett (1995). Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206** 750-754.
- Post, T. W., M. K. Liszewski, E. M. Adams, I. Tedja, E. A. Miller und J. P. Atkinson (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med* **174** (1): 93-102.
- Potgieter, L. N. D., M. D. McCracken, F. M. Hopkins und J. S. Guy (1985). Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* **46** 151-153.
- Pritchard, W. R. (1963). The bovine viral diarrhea- mucosal disease complex. *Adv Vet Sci* **8** 1-47.
- Purcell, D. F., S. M. Russell, N. J. Deacon, M. A. Brown, D. J. Hooker und I. F. McKenzie (1991). Alternatively spliced RNAs encode several isoforms of CD46 (MCP), a regulator of complement activation. *Immunogenetics* **33** (5-6): 335-44.
- Reimann, I., K. Depner, S. Trapp und M. Beer (2004). An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology* **322** (1): 143-57.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz und S. C. Harrison (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375** (6529): 291-8.
- Ridpath, J. und S. R. Bolin (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* **212** 39-46.
- Rijnbrandt, R., T. van der Straaten, P. A. van Rijn, W. J. Spaan und P. J. Bredenbeek (1997). Internal ribosomal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine

fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon J Virol **71** (1): 451-7.

Riley, R. C., C. Kemper, M. Leung und J. P. Atkinson (2002). Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. Mol Reprod Dev **62** (4): 534-46.

Rinck, G., C. Birghan, T. Harada, G. Meyers, H. J. Thiel und N. Tautz (2001). A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. J Virol **75** (19): 9470-82.

Risatti, G. R., L. G. Holinka, I. Fernandez Sainz, C. Carrillo, Z. Lu und M. V. Borca (2007). N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine. J Virol **81** (2): 924-33.

Ronecker, S., G. Zimmer, G. Herrler, I. Greiser-Wilke und B. Grummer (2008). Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. J Gen Virol **89** (Pt 9): 2114-21.

Rothwangl, K. B., B. Manicassamy, S. L. Uprichard und L. Rong (2008). Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. Virol J **5** 46.

Rümenapf, T., G. Meyers, R. Stark und H. J. Thiel (1991a). Molecular characterization of hog cholera virus. Arch Virol Suppl **3** 7-18.

Rümenapf, T., R. Stark, G. Meyers und H. J. Thiel (1991b). Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. J Virol **65** (2): 589-597.

Rümenapf, T. und H. J. Thiel (2008). In Animal Viruses: Molecular Biology. Molecular Biology of Pestiviruses. Caister Academic Press.

Rümenapf, T., G. Unger, J. H. Strauss und H. J. Thiel (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. J Virol **67** (6): 3288-94.

Saatkamp, H. W., P. B. Berentsen und H. S. Horst (2000). Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. Vet Microbiol **73** (2-3): 221-237.

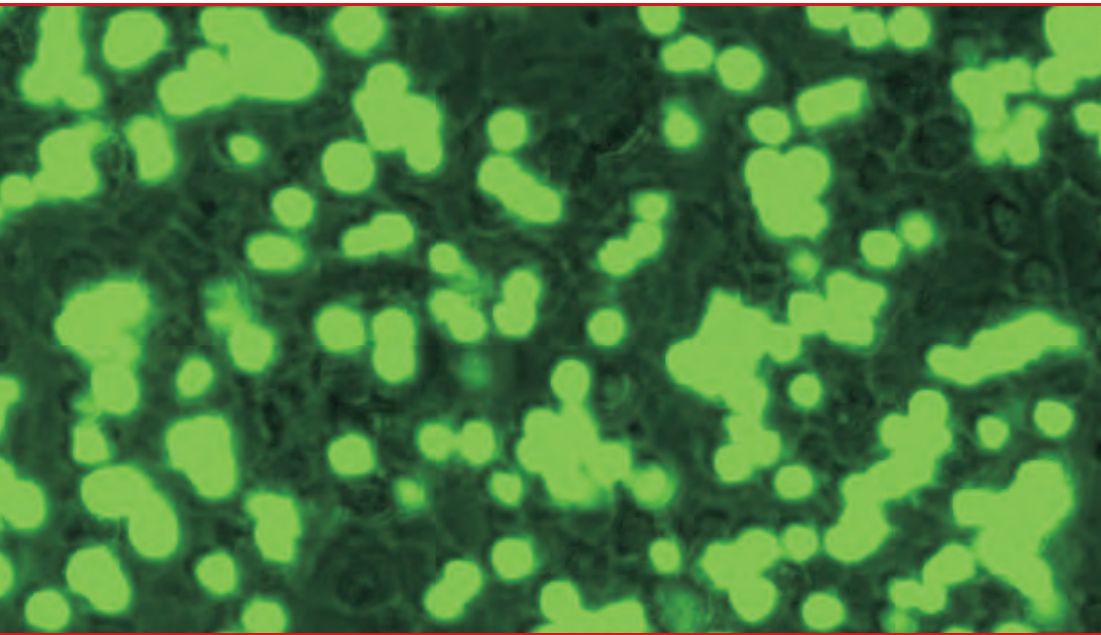
Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Press.

Santoro, F., P. E. Kennedy, G. Locatelli, M. S. Malnati, E. A. Berger und P. Lusso (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. Cell **99** (7): 817-27.

- Schelp, C., I. Greiser-Wilke, G. Wolf, M. Beer, V. Moennig und B. Liess (1995). Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch Virol* **140** (11): 1997-2009.
- Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer und H.-J. Thiel (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261** 1169-1171.
- Shaw, I. G., C. E. Winkler und S. Terlecki (1967). Experimental reproduction of hypomyelogenesis congenita of lambs. *Vet Rec* **81** 115-116.
- Stark, R., G. Meyers, T. Rümenapf und H. J. Thiel (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67** 7088-7095.
- Strandstrom, H., P. Veijalainen, V. Moennig, G. Hunsmann, H. Schwarz und W. Schafer (1974). C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. I. Origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of C-type-like particles. *Virology* **57** (1): 175-8.
- Sutter, G., M. Ohlmann und V. Erfle (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters* **371** 9-12.
- Tardieu, M., R. L. Epstein und H. L. Weiner (1982). Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int Rev Cytol* **80** 27-61.
- Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumfeller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger und M. A. Marovich (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197** (7): 823-9.
- Tautz, N., K. Elbers, D. Stoll, G. Meyers und H.-J. Thiel (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* **71** (7): 5415-22.
- Thiel, H. J., P. G. Plagemann und V. Moennig (1996). In *Fields Virology. Pestiviruses*. Philadelphia, New York, Lippincott - Raven Publishers
- Thiel, H. J., R. Stark, E. Weiland, T. Rümenapf und G. Meyers (1991). Hog Cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65** (9): 4705-12.
- Tscherne, D. M., M. J. Evans, M. R. Macdonald und C. M. Rice (2008). Transdominant inhibition of bovine viral diarrhea virus entry. *J Virol* **82** (5): 2427-36.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara und A. Nomoto (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66** (3): 1476-83.

- van Rijn, P. A. (2007). A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF)? *Vet Microbiol* **125** (1-2): 150-6.
- van Rijn, P. A., G. K. W. Miedema, G. Wensvoort, H. G. P. van Gennip und R. J. M. Moormann (1994). Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol* **68** 3934-3942.
- van Rijn, P. A., H. G. van Gennip, E. J. de Meijer und R. J. Moormann (1993). Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. *J Gen Virol* **74** (Pt 10) 2053-60.
- van Rijn, P. A., H. G. van Gennip, C. H. Leendertse, C. J. Bruschke, D. J. Paton, R. J. Moormann und J. T. van Oirschot (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* **237** (2): 337-48.
- Vantsis, V. T., K. A. Linklater, J. C. Rennie und R. M. Barlow (1979). Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J Comp Path* **89** 331-339.
- Vilcek, S. und S. Belak (1996). Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* **60** (1): 103-8.
- Walz, P. H., J. C. Baker, T. P. Mullaney und R. K. Maes (2004). Experimental inoculation of pregnant swine with type 1 bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51** (4): 191-3.
- Wang, Z., Y. Nie, P. Wang, M. Ding und H. Deng (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology* **330** (1): 332-41.
- Weiland, E., R. Ahl, R. Stark, F. Weiland und H. J. Thiel (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* **66** (6): 3677-82.
- Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf, G. Meyers und H. J. Thiel (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64** (8): 3563-3569.
- Weiner, A. J., M. J. Brauer, J. Rosenblatt, K. H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q. L. Choo, M. Houghton und et al. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180** (2): 842-8.
- Wengler, G., C. Gros und G. Wengler (1996). Analyses of the role of structural changes in the regulation of uncoating and assembly of alphavirus cores. *Virology* **222** (1): 123-32.

- White, J. M. und D. R. Littman (1989). Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56** (5): 725-8.
- Wieringa-Jelsma, T., S. Quak und W. L. Loeffen (2006). Limited BVDV transmission and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with BVDV type 1b. *Vet Microbiol* **118** (1-2): 26-36.
- Windisch, J. M., R. Schneider, R. Stark, E. Weiland, G. Meyers und H.-J. Thiel (1996). RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* **70** 352-358.
- Wiskerchen, M., S. K. Belzer und M. S. Collett (1991). Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* **65** 4508-4514.
- Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M. A. Murcko, M. S. Collett und C. M. Rice (1997). Bovine diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* **71** (7): 5312-5322.
- Xue, W. und H. C. Minocha (1993). Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol* **74** (Pt 1) 73-9.
- Xue, W. und H. C. Minocha (1996). Identification of bovine viral diarrhea virus receptor in different cell types. *Vet Microbiol* **49** (1-2): 67-79.
- Xue, W., D. J. Orten, O. Y. Abdelmagid, M. Rider, F. Blecha und H. C. Minocha (1991). Anti-idiotypic antibodies mimic bovine viral diarrhea virus antigen. *Vet Microbiol* **29** (3-4): 201-12.
- Yu, M., L. F. Wang, B. J. Shiell, C. J. Morrissy und H. A. Westbury (1996). Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses. *Virology* **222** (1): 289-92.
- Zhang, F., M. Yu, E. Weiland, C. Morrissy, N. Zhang, H. Westbury und L. F. Wang (2006). Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library. *Arch Virol* **151** (1): 37-54.
- Zhou, Y., M. Konig, G. Hobom und E. Neumeier (1998). Membrane-anchored incorporation of a foreign protein in recombinant influenza virions. *Virology* **246** (1): 83-94.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5455-5

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 1954557